

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Técnicas biológicas para la degradación de contaminantes

**Monografía previa a la obtención del título de Licenciado
en Ciencias Biológicas**

LUIS MANUEL CABRERA TACO

Quito, 2015

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Monografía de Licenciatura en Ciencias Biológicas, del Sr. Luis Manuel Cabrera Taco ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Mtr. Miryan Rivera

Directora de la monografía

Quito, 27 de marzo del 2015

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
4. DESARROLLO TEÓRICO	8
4.1 CLASIFICACIÓN DE TÉCNICAS USADAS PARA SANEAR CONTAMINANTES	8
4.2 DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DE CIANURO DE SODIO	13
4.2.1 INTOXICACIÓN POR CIANURO	15
4.2.2 QUÍMICA DEL CIANURO.....	16
4.2.3 TIPOS DE TRATAMIENTO DE ELIMINACIÓN DE CIANURO.....	18
4.2.3.1 Tratamientos físico químicos.....	19
4.2.3.2 Tratamiento por oxidación biológica del cianuro	26
4.2.4 FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN	28
4.2.5 ENSAYOS REALIZADOS EN BIODEGRADACIÓN Y ASIMILACIÓN DEL CIANURO Y SUS DERIVADOS POR <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT5344 Y <i>Pseudomonas fluorescens</i>	32
4.3 BACTERIAS Y MOHOS REDUCTORES DE CROMO (VI) PRESENTES EN RAÍCES DE PLANTAS ACUÁTICAS	40
4.3.1 TOXICIDAD DEL CROMO	41
4.3.2 INTERACCIONES MICROBIANAS CON EL CROMATO.....	42
4.3.2.1 Transporte y acumulación de cromo (bioacumulación)	43
4.3.2.2 Interacción y unión con componentes de la superficie celular (Biosorción)	44
4.3.2.3 Transformación Química (Reducción).....	45
4.3.3 REDUCCIÓN ENZIMÁTICA DE CROMO (VI)	46
4.3.4 BIOSORCIÓN DE CROMO.....	50
4.4 DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DE COMPUESTOS ORGÁNICOS ARÓMATICOS	52
4.4.1 OXIGENASAS	59
4.4.2 VÍAS METABÓLICAS.....	61
4.4.3 AISLAMIENTO DE CEPAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS	63
4.4.4 ENSAYOS REALIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS.....	63
4.4.4.1 Análisis de Fragmentos de Restricción en Gel de Agarosa.....	66
4.4.4.2 Determinación de degradación de Tolueno mediante HPLC.....	68
4.4.5 RESULTADOS: IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS.....	70
4.4.6 APLICACIONES DE HONGOS EN TRATAMIENTOS DE BIORRECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS	72

4.5 SURFACTANTES EN LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS	84
4.5.1 APLICACIÓN DE SURFACTANTES EN LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS	85
4.5.2 FACILIDAD DEL SURFACTANTE DE SER BIODEGRADADO POR LOS MICROORGANISMOS.....	92
5. CONCLUSIONES.....	93
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
7. FIGURAS.....	114
8. TABLAS.....	124

1. RESUMEN

Las medidas biológicas para la restauración ambiental consisten principalmente en el uso de los organismos vivos como plantas, levaduras, hongos y bacterias, presentes en el entorno para descomponer, degradar, transformar y en muchos casos metabolizar sustancias peligrosas en otras de carácter menos tóxico o bien inocuas para el medio ambiente y la salud humana. El uso de microorganismos como herramientas biocorrectoras se llevan empleando en la descontaminación de suelos y aguas alterados por compuestos orgánicos naturales y sintéticos (xenobióticos) desde hace varios años con importante éxito. Estas técnicas biológicas pueden ser de tipo aerobio, si se producen en condiciones aerobias, es decir en presencia de un medio oxidante, o bien de tipo anaerobio, en presencia de un medio reductor. Las técnicas de degradación biológica de contaminantes se fundamentan en la determinación de tipos de células, moléculas y rutas metabólicas empleadas por los organismos como estrategia para alcanzar el objetivo deseado; así como en las condiciones físicas, químicas y ambientales, ideales para el correcto funcionamiento de estas biomáquinas. El daño causado en las poblaciones de microorganismos por la presencia de contaminantes y su concentración (degradación biológica por contaminantes), en muchos años de estrés, obliga a que éstos se adapten y evolucionen con nuevas y novedosas características metabólicas para explotar fuentes de alimento alternativas, cuya consecuencia es el saneamiento de compuestos tóxicos, lo que produjo un efecto contrario positivo. La rápida evolución se da gracias a la plasticidad del genoma y a la transferencia génica. La ventaja selectiva de cepas, poblaciones y consorcios microbianos a contaminantes las hizo capaces de alimentarse de ellos logrando la

degradación biológica de contaminantes. Es así que hoy en día se investiga a profundidad a los organismos capaces de transformar los contaminantes, a sus estructuras, a su proteoma, a su genoma así como sus estrategias metabólicas para alcanzar tal fin. Los resultados obtenidos serán la herramienta fundamental para su uso a nivel industrial, base de la biotecnología aplicada. El presente estudio realiza un recorrido por la literatura existente y se centra en el análisis de varios tipos de organismos y su relación directa con sus sustratos contaminantes para alcanzar a través de su metabolismo celular la total o parcial transformación de productos peligrosos, identificando los aspectos generales, ventajas y desventajas del uso de esta técnica.

Palabras clave: Biodegradación, Cadena respiratoria, Desorción, Xenobióticos

2. ABSTRACT

The biological measures for environmental restoration consist, mainly, in the use of living organisms such as plants, yeast, fungi and bacteria present in the environment to decompose, degrade, transform and often metabolize hazardous substances into substances less toxic nature or harmless to the environment and human health. For several years, microorganisms has been used, with great success, as biocorrectors tools for the decontamination of soil and water altered by organic compounds, both, natural and synthetic (xenobiotic). These biological techniques may be aerobic type, in the presence of an oxidizing medium, or anaerobic type, in the presence of a reducing medium. The techniques of biological degradation of pollutants are based on the determination of cell types, molecules and metabolic pathways used by organisms as a strategy to achieve a desired objective; and physical-chemical conditions and environmental ideal for the proper functioning of these biomachines. The damage to a microbial population by the presence of contaminants and their concentration (biological degradation pollutants), together with many years of stress, forced these organisms to adapt, developing innovative metabolic characteristics to exploit alternative food sources, the consequence is the sanitation of toxic compounds, which produced a positive opposite effect. The rapid evolution is a consequence of genome plasticity and gene transfer, the selective advantage of strains, populations and microbial consortia to pollutants made them able to feed from these substances, achieving biological degradation of contaminants. Thus, nowadays, it is investigated, in depth, organisms capable of transforming pollutants, their structures, their proteome, its genome and metabolic strategies to achieve this objective. The results will be the

main tool for its use at industrial level, the basis of applied biotechnology. This study takes a journey through the literature and will focus on the analysis of various types of organisms and their direct relationship with their polluting substrates to achieve, through its cellular metabolism, total or partial transformation of dangerous products, identifying the general aspects , advantages and disadvantages of using this technique.

Key words: Biodegradation, Respiratory Chain, Desorption, Xenobiotic

3. INTRODUCCIÓN

La degradación en términos biológicos es el modo en el que la naturaleza trabaja para tratar de absorber los elementos que son producidos y descartados por el ser humano. La degradación de los elementos orgánicos es mucho más simple y rápida, otros productos como compuestos inorgánicos sintéticos, plásticos, metales, vidrio, pueden llevar mucho más tiempo en degradarse y por lo tanto volverse un problema ambiental.

El proceso de degradación ocurre en materiales, productos, objetos o sustancias que pierden sus características iniciales o sus rasgos esenciales para volverse algo más simple. A nivel natural, la degradación de estos elementos comienza cuando está siendo transformado por la naturaleza para poder absorberlo, muchas veces como respuesta de defensa.

Los sistemas de biodescontaminación se basan en la digestión de las sustancias tóxicas por medio de organismos, de la cual obtienen la fuente de alimento necesario para el crecimiento de sus células y una fuente de energía para llevar a cabo todas las funciones metabólicas. Para que estos procesos metabólicos se lleven a cabo, y puedan ser utilizados como una técnica de saneamiento, es necesario que exista en el entorno condiciones físico-químicas óptimas.

Ciertos microorganismos pueden digerir sustancias orgánicas peligrosas para los seres humanos, como combustibles o solventes y descomponerlos en

productos inocuos, principalmente dióxido de carbono y agua. La degradación de estas sustancias les proporciona nutrientes y energía.

Se necesitará la existencia de determinadas poblaciones de organismos autóctonos capaces de utilizar los componentes tóxicos como fuente nutricional y de energía. A su vez, será necesario un determinado número de moléculas aceptores de electrones que enzimáticamente oxiden los contaminantes, así como unas condiciones adecuadas de pH, nutrientes, temperatura, humedad, textura y estructura del sustrato, y concentración de los contaminantes.

Cuando las moléculas donan electrones (DE, se oxidan), necesitan de otras moléculas que a la vez acepten electrones (AE, se reduzcan), y de esta forma se obtiene la energía necesaria en el desarrollo celular Adenosin Trifosfato (ATP). Durante el proceso de oxidación de los hidrocarburos HC's, los microorganismos pueden utilizar AE como el oxígeno (O_2), nitrato (NO_3^-), hierro (Fe^{+2}), y sulfato (SO_4^{2-}) (Eweis *et al.*, 1999). El O_2 es el AE más utilizado por los microorganismos, ya que proporciona mayor rendimiento en la síntesis de Adenosin trifosfato ATP, gracias a la liberación de hidrogeniones generados por la transferencia de electrones que a su vez generan un gradiente electroquímico (Eweis *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2000).

El más promisorio avance para sanear ambientes contaminados es la biodegradación, explorando y estudiando las funciones catabólicas de los microorganismos (Furukawa, 2000). La biodegradación permite que compuestos orgánicos, puedan ser eliminados del ambiente por biooxidación (Huy, *et al.*, 1999).

Esta técnica, explota la diversidad genética y metabólica de los microorganismos para transformar los contaminantes en productos finales menos peligrosos (CO_2 , H_2O) y puedan ser integrados en los ciclos bio-geoquímicos naturales (Colwell y Leahy, 1999; Alkorta y Garbisu, 1999).

La fisiología microbiana es la interfase entre los descubrimientos biológicos y la ingeniería genética por un lado y la biotecnología, bioquímica ambiental y la explotación de la productividad microbiana por otro. El desarrollo de organismos novedosos para su uso en biodegradación ha sido el desafío en estos últimos tiempos (Haro y V. de Lorenzo, 2001).

El presente estudio reporta ciertas sustancias o compuestos peligrosos como los Hidrocarburos aromáticos poli cíclicos HAPs, hidrocarburos derivados del petróleo, metales pesados como el cromo y cianuros que han demostrado ser degradados por organismos vivos, los organismos presentan esta capacidad, su eficacia para asimilarlos en mayor o menor grado, así como sus estrategias y rutas metabólicas para lograr el efecto deseado.

El objetivo de este trabajo es proveer de una visión que describa los organismos, las enzimas o moléculas, y las vías metabólicas más idóneos, que pueden ser escogidos, como herramienta y punto de partida para transformar o descomponer compuestos peligrosos en formas menos tóxicas o inocuas para el medio ambiente y la salud humana, así como conocer ciertos aspectos de las tecnologías de biorecuperación y de los avances en el conocimiento del metabolismo.

4. DESARROLLO TEÓRICO

4.1 CLASIFICACIÓN DE TÉCNICAS USADAS PARA SANEAR CONTAMINANTES

Se denomina contaminación ambiental a la presencia en el ambiente de cualquier agente (físico, químico o biológico) o bien de una combinación de varios agentes en lugares, formas y concentraciones tales que puedan ser nocivas para la salud, la seguridad o para el bienestar de la población, para la vida vegetal o animal, o impidan el uso normal de las propiedades de una área determinada (Domínguez *et al.*, 2011).

A fin de contrarrestar a estos agentes contaminantes, a nivel mundial se han desarrollado un gran número de opciones de saneamiento para los sitios alterados, se las puede clasificar de diferentes maneras. Una de las clasificaciones más comunes se realiza sobre la base de su principio de funcionamiento; así, se tienen técnicas biológicas, fisicoquímicas y térmicas.

Las técnicas más conocidas y aplicadas son las siguientes:

Biológicas: biorestauración, fitorestauración, etc.

Fisicoquímicas: solidificación, estabilización, extracción de vapores, oxidación avanzada, oxido reducción etc.

Térmicas: desorción por inyección de vapor, incineración, etc.

Otra clasificación se basa en el efecto sobre los contaminantes producidos por las técnicas de saneamiento. De esta manera se tienen técnicas de retención, extracción, separación y destrucción. En la práctica las dos clasificaciones mencionadas son válidas e incluso complementarias.

Retención: confinamiento en celdas, barreras impermeables, fijación, etc.

Extracción o separación: filtración por carbón activado, lavado con agentes tensoactivos, extracción de producto libre, extracción de vapores, etc.

Destrucción: biorestauración, fitorestauración, incineración, etc.

Las medidas biocorrectoras pueden usarse como método para descontaminar tanto suelos como aguas. Estas medidas se clasifican en dos grandes categorías: *in situ* y *ex situ*. Con medidas biocorrectivas *in situ* se trata la tierra contaminada o el agua subterránea en el lugar donde se encuentra. Las medidas biocorrectivas *ex situ* consisten en extraer el sustrato contaminado o extraer el agua subterránea por bombeo para aplicar el tratamiento (Figura 1).

En la medida que se identifiquen las ventajas, desventajas y limitaciones de las diferentes técnicas disponibles, se podrá hacer una adecuada selección. Todas ellas derivarán en consecuencias e impactos, sean estos positivos o negativos que a su vez dependerán del tipo de contaminante, de su concentración y disponibilidad.

Algunos de los parámetros más importantes a tomar en consideración para la caracterización de un emplazamiento contaminado, incluyen la biodegradabilidad, la distribución del contaminante en las distintas fases, el

potencial de lixiviación, la reactividad química de los contaminantes, el tipo y propiedades del suelo, la disponibilidad de oxígeno y la presencia o ausencia de sustancias inhibidoras (Moreno *et al.*, 2004).

Las Tecnologías Avanzadas de Oxidación TAOs se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes (Bolton *et al.*, 1994; Legrini *et al.*, 1993). El concepto fue inicialmente establecido por Glaze y colaboradores (1987), quienes definieron los Procesos Avanzados de Oxidación PAOs como procesos que involucran la generación principalmente del radical hidroxilo (HO^\cdot).

Este radical puede ser generado por medios fotoquímicos (incluida la luz solar) o por otras formas de energía, y posee alta efectividad para la oxidación de materia orgánica. Algunas TAOs, como la fotocatálisis heterogénea, la radiólisis y otras técnicas avanzadas, recurren además a reductores químicos que permiten realizar transformaciones en contaminantes tóxicos poco susceptibles a la oxidación, como iones metálicos o compuestos halogenados.

La Tabla 1 muestra un listado comparativo de las TAOs, clasificadas en procesos no fotoquímicos y procesos fotoquímicos.

Los procesos involucrados poseen una mayor factibilidad termodinámica y una velocidad de oxidación muy incrementada por la participación de radicales, principalmente el radical hidroxilo, HO^\cdot . Esta especie posee propiedades adecuadas para atacar virtualmente a todos los compuestos orgánicos y reaccionar

10^6 - 10^{12} veces más rápido que oxidantes alternativos como el O_3 . La Tabla 2 presenta potenciales de oxidación de distintas especies, muestra que después del flúor, el HO^\cdot es el oxidante más energético. Existe una gran diferencia entre las constantes de velocidad de reacción de distintos compuestos con el radical hidroxilo y con el ozono.

Para ser eficientes, las Tecnologías Avanzadas de Oxidación TAOs deben generar altas concentraciones de radicales hidroxilo en estado estacionario, es decir no debe haber reacciones de ramificación de cadena ni aumento rápido en el número de radicales libres (Domenech *et al.*, 1987), por ejemplo cuando un radical produce dos radicales, el oxígeno molecular reacciona con los átomos de hidrógeno originando radicales hidroxilo y átomos de oxígeno.

Las TAOs son especialmente útiles como pretratamiento antes de un tratamiento biológico para contaminantes resistentes a la biodegradación o como proceso de postratamiento para efectuar un pulido de las aguas antes de la descarga a los cuerpos receptores (Domenech *et al.*, 1987).

Las técnicas biológicas están basadas en la degradación de compuestos contaminantes complejos hasta compuestos simples, mediante la actividad de organismos vivos que los utilizan como fuente de carbono, nitrógeno, potasio, hierro y energía. Normalmente ocurre en sustratos acuosos o semiacuosos y cuerpos de agua donde los contaminantes son biodegradables o biotransformables, o bien, cuando se trata de compuestos inorgánicos bioacumulables o biotransformables que están presentes en cuerpos de agua en movimiento.

El presente análisis se centrará fundamentalmente en las metodologías de degradación de contaminantes con el uso de organismos vivos, es decir en las técnicas biológicas, porque son ambientalmente las más seguras y proveen de una destrucción o transformación completa de los contaminantes.

Los siguientes subcapítulos abordarán temas como los distintos tipos de tratamiento utilizados actualmente para el saneamiento ambiental, sus ventajas y desventajas, la biodegradación de compuestos cianurados sus alternativas químicas, físicas y fotolíticas, degradación microbiana del cromo (VI), Bioremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos; los organismos que intervienen en estos procesos, enzimas protagonistas de sus vías metabólicas y las condiciones ambientales para que esto ocurra.

La biodescontaminación es un proceso natural espontáneo o dirigido en el cual mediante procedimientos biológicos se descomponen sustancias peligrosas pero también se puede aplicar a muchos desechos orgánicos comunes.

Las técnicas biocorrectoras pueden aplicarse en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. En condiciones aerobias los microorganismos usan el oxígeno de la atmósfera para convertir muchos contaminantes orgánicos en dióxido de carbono y agua. En condiciones anaerobias, la actividad biológica tiene lugar en ausencia de oxígeno, de modo que los microorganismos descomponen compuestos químicos del suelo para liberar la energía que necesitan.

4.2 DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DE CIANURO DE SODIO

El cianuro es un anión monovalente compuesto de un átomo de carbono conectado a uno de nitrógeno por tres enlaces ($\text{-C}\equiv\text{N}$ grupo ciano). Las principales formas de cianuro producidas por el hombre son el cianuro de hidrógeno gaseoso, el cianuro sólido de sodio y de potasio (Logsdon *et al.*, 2003), se forman por la unión del grupo cianuro con el átomo de sodio o potasio y son sustancias persistentes altamente tóxicas.

Los cianuros pueden encontrarse en forma natural o ser manufacturados; Existen más de 2,000 fuentes naturales de cianuro, entre ellos, distintas especies de artrópodos, insectos, bacterias, algas, hongos y plantas superiores (Tabla 3). La mayoría son venenos potentes y de acción rápida. Las principales formas de cianuro producidas por el hombre son el cianuro de hidrógeno (HCN), que es un gas, y las sales simples de cianuro (cianuro de sodio y cianuro de potasio). Es muy reactivo, inclusive en muy bajas concentraciones con metales pesados y puede absorberse por los tejidos vegetales y animales con facilidad, aunque en medios aerobios puede oxidarse a ión cianato (OCN^-) que es 1000 veces menos tóxico (Eisler *et al.*, 1991).

El cianuro puede presentarse como cianuro libre (cianuro dissociado o ion de cianuro no complejo) que comprende las formas de cianuro molecular (HCN) e iónica (CN^-), como cianuros simples que son las sales del ácido cianhídrico, formando complejos con metales de transición y uniéndose a sustancias orgánicas formando los nitrilos.

Muchos de los cianuros en el suelo o el agua provienen de procesos industriales. Las fuentes principales de cianuro en el agua son las descargas de algunos procesos de minado de minerales, industrias de sustancias químicas orgánicas, plantas o manufactura de hierro o acero y facilidades públicas para el tratamiento de aguas residuales. Otras fuentes de cianuro son el tubo de escape de vehículos, liberaciones desde algunas industrias químicas, la incineración de basura municipal y el uso de ciertos plaguicidas.

Anualmente se utiliza más de un millón de toneladas de compuestos de cianuro en la producción de químicos orgánicos como el nitrilo, nylon y plásticos acrílicos, así como en las industrias de la galvanoplastia, el procesamiento de metales, la extracción del oro y plata, el endurecimiento del acero, fumigación de barcos, revelado de fotografías, fabricación de goma sintética y metalurgia.

El cianuro es uno de los pocos reactivos químicos que logra convertir el oro (insoluble en agua) en aniones metálicos complejos de aurocianida, solubles en agua. Es una sustancia química industrial común que se consigue fácilmente a un precio razonablemente bajo. Por razones técnicas y económicas, el cianuro es la sustancia química elegida para la recuperación del oro. Las operaciones mineras para la extracción de oro utilizan soluciones muy diluidas de cianuro de sodio, típicamente entre 100 a 500 partes por millón (ppm).

Para el parámetro de cianuro, expresado como CN en mg/l, se establece un valor máximo de 1.0 (Acercar, 2003), en el caso que la descarga ocurra en un cuerpo de agua dulce el límite máximo permisible es de 0,1 mg/l.

Las técnicas pioneras en el tratamiento de aguas contaminadas con productos orgánicos resistentes a la biodegradabilidad, son los Procesos de Oxidación Avanzada (POA), éstos se emplean como un pretratamiento modificando la estructura de los contaminantes, los cuales se transforman en sustancias menos nocivas o fácilmente biodegradables, permitiendo entonces que procesos biológicos completen la degradación del contaminante después de un tratamiento fotocatalítico (Blanco y Malato, 2001; Doménech *et al.*, 2001).

4.2.1 INTOXICACIÓN POR CIANURO

El cianuro es un inhibidor enzimático que bloquea la producción de Adenosin Trifosfato ATP, interfiere con la función de metaloproteínas respiratorias como la citocromo c oxidasa, una enzima que promueve el traspaso de electrones a las mitocondrias durante la síntesis de ATP, si la enzima no funciona correctamente, las células no aprovechan el oxígeno del torrente sanguíneo induciendo a la hipoxia celular o citotóxica. La ingestión de 200 mg de cianuro de potasio o de sodio puede ser letal (Huertas *et al.*, 2004).

Es muy rápido el inicio de los signos y síntomas luego de una exposición, incluyen náuseas, olor a almendras amargas, convulsiones, coma, depresión respiratoria, colapso cardíaco entre otras. (Córdoba, 2000; Fuentes y Gómez, 2001).

4.2.2 QUÍMICA DEL CIANURO

Cianuro libre

“Cianuro libre” es el término utilizado para describir tanto el ión de cianuro (CN^-) que se disuelve en agua, como cualquier cianuro de hidrógeno (HCN) que se forma en la solución. El cianuro de sodio se disuelve en el agua para formar el ión de sodio y el anión de cianuro (CN^-). El anión de cianuro se combina luego con el ión de hidrógeno para formar HCN molecular. Casi todo el cianuro libre está presente como HCN, cuando hay abundantes iones de hidrógeno presentes, es decir, a un valor de pH de 9,3 o menos, entonces, puede volatilizarse y dispersarse en el aire. Cuando el pH es superior a 10,5, hay pocos iones de hidrógeno presentes y casi todo el cianuro libre está presente como CN^- . En condiciones normales de temperatura y presión, las concentraciones de HCN y CN^- son iguales a un valor de pH de aproximadamente 9.4. La Figura 2 muestra la relación entre el HCN y el cianuro con el pH (Smith *et al*, 1991).

Estas formas de cianuro libre son importantes porque se consideran como los cianuros más tóxicos. Sin embargo, también son las formas que se eliminan más fácilmente de las soluciones mediante elaborados procesos de tratamiento y mecanismos naturales de atenuación.

Complejos de Cianuro

Cuando los elementos químicos se combinan en una solución para formar especies solubles, se llaman “complejos”. Los complejos de cianuros metálicos alcalinos pueden ser representados por: $A_yM(CN)_x$. A representa el elemento alcalino, (y) veces en que está presente el elemento alcalino, M el metal pesado y (x) el número de grupos CN^- . La disociación inicial de cada uno de estos complejos de cianuro solubles producen un anión que es el radical $M(CN)_x y^-$. Este puede disociarse con la liberación de CN^- y la consecuente formación de HCN (Smith *et al*, 1991).

Los químicos distinguen entre los complejos “débiles” y “fuertes” de cianuro. Los complejos débiles de cianuro, con frecuencia denominados cianuros “disociables en ácidos débiles” o cianuros DAD (WAD), pueden disociarse en cianuro libre y su grado de disociación depende del pH de la solución. Los complejos débiles incluyen complejos de cianuro de cadmio, cobre, níquel, plata y zinc.

Por otra parte, los complejos fuertes de cianuro se degradan mucho más lentamente que el cianuro DAD en condiciones químicas y físicas normales. Los complejos de cianuro con oro, cobalto y hierro son fuertes y estables en solución (Logsdon *et al*, 2003).

4.2.3 TIPOS DE TRATAMIENTO DE ELIMINACIÓN DE CIANURO

Existen varios procesos para degradar el cianuro en sustancias menos tóxicas para el ambiente, entre los que se encuentran principalmente los tratamientos químicos y biológicos.

Hoy en día existen varias formas de tratar las descargas de cianuro al ambiente, bien sea por métodos tradicionales de separación los cuales transfieren la sustancia tóxica de una corriente a otra por lo cual el problema de fondo persiste, o bien sea por métodos de remediación que buscan por su parte degradar estas sustancias y transformarlas en otras no tóxicas o menos tóxicas (Parra *et al.*, 2001).

La incapacidad de los métodos tradicionales en el tratamiento de aguas residuales para remover efectivamente muchos contaminantes biorecalcitrantes pone en evidencia la necesidad de nuevos sistemas de tratamientos eficientes. Además de los procesos biológicos, muchos sistemas de oxidación son empleados corrientemente en diferentes etapas de desarrollo. Durante los últimos 25 años, las investigaciones en purificación de aguas han crecido extensivamente. El riguroso control de contaminantes y la legislación en muchos países han conllevado a una búsqueda intensa para nuevas tecnologías de tratamiento más eficientes (Parra *et al.*, 2001)

4.2.3.1 Tratamientos físico químicos

Una nueva técnica de degradación es la combinación de procesos solares y biológicos para el tratamiento de sustancias orgánicas no biodegradables presentes en sistemas acuosos; antes de un tratamiento biotecnológico es necesario realizar pretratamientos fisicoquímicos para modificar la estructura de los contaminantes, transformándolos en sustancias menos nocivas e intermediarios fácilmente biodegradables.

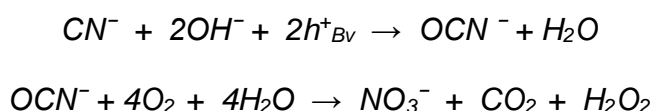
La Figura 3 muestra un acoplamiento a escala industrial de los procesos Fotocatalíticos y Biotecnológicos.

Con el transcurso del tiempo, los procesos naturales, como la exposición a la luz del sol, pueden reducir la concentración de las formas tóxicas del cianuro en soluciones a valores muy bajos.

El tratamiento de oxidación fotolítica presenta una gran ventaja sobre otras técnicas ya que asegura la destrucción de los cianuros sin generarse compuestos intermedios extremadamente tóxicos, como es el caso del cloruro de cianógeno en la cloración, y evitándose también la posibilidad de reversibilidad de alguna de las reacciones (Blanco y Malato, 2001).

Los cianuros libres no absorben radiación solar en las longitudes de onda superior a 300 nanómetros (nm), espectro solar, por lo tanto la fotólisis no juega un papel importante en la degradación de estos compuestos. En la degradación

fotolítica la oxidación tiene lugar directamente en la superficie de la partícula del semiconductor, siendo la radiación solar la única fuente de energía empleada y el oxígeno disuelto el único oxidante. En este sentido, se ha demostrado que la oxidación fotolítica conduce a una transformación cuantitativa del cianuro a cianato (CN^- a OCN^-), tal como se constata en la siguiente reacción de oxidación fotolítica (Blanco y Malato, 2001).



La fotocatalisis, es una reacción catalítica que involucra absorción de luz por un catalizador o un sustrato, entendiendo como catálisis la acción de un catalizador y como catalizador una sustancia que incrementa la velocidad de reacción sin modificar el cambio en la energía de Gibbs estándar de la reacción (Serpone y Emeline, 2002).

Cuando una partícula del catalizador es excitada con luz suficientemente energética ($h\nu$), un electrón (e^-) es promovido de la banda de valencia a la banda de conducción originando un hueco (h^+), este fenómeno es conocido como el par electrón-hueco.

En los semiconductores una porción de los pares electrón-hueco fotoexcitados se difunde a la superficie de la partícula catalítica (los pares electrón-hueco son atrapados en la superficie) y toman parte en la reacción química con el dador adsorbidos (D) o el aceptor (A). Los huecos pueden oxidar la molécula

dadora, mientras que los electrones de la banda de conducción pueden reducir apropiadamente las moléculas aceptoras de electrones (Benedix, 2000).

Se han realizado ensayos para fotodegradar el cianuro empleando luz artificial, presente en una corriente residual producto del proceso de lixiviación de la industria minera, en los que se obtiene en un tiempo de recirculación de dos horas un porcentaje de reducción en la concentración de cianuro de 65,50% (Serpone y Emeline, 2002).

Oxidación Química

Este tipo de métodos permiten alcanzar la detoxificación de los residuos por transformación química del cianuro mediante la adición de un agente oxidante, destruyendo el cianuro e imposibilita su reutilización.

Los principales inconvenientes que presentan estos tratamientos químicos son el requerimiento de agentes oxidantes tóxicos, el elevado coste de infraestructuras y reactivos, y la generación de productos perjudiciales para el medio ambiente y la salud (cianato, metales, cloruro de cianógeno, etc).

Adición de Dióxido de Azufre:

El proceso utiliza dióxido de azufre (SO_2)/aire en presencia de un catalizador de cobre, para oxidar cianuro en sustancias menos tóxicas (Cianato). En el proceso con SO_2 /Aire, el cianuro libre y el cianuro dissociable en ácidos débiles (DAD) se

oxidan y el cianuro de hierro se precipita como un sólido insoluble. El proceso puede aplicarse a soluciones o a lodos y la reacción es rápida.

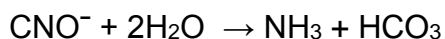
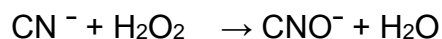
Oxidación con peróxido de hidrógeno

Se aplica para tratamiento de complejos de zinc y de cadmio. El peróxido de hidrógeno, un potente oxidante, oxida el cianuro libre y el cianuro dissociable en ácidos débiles DAD y los convierte en amonio y carbonato. Los cianuros de hierro no se oxidan mediante el peróxido, pero precipitan como sólidos insolubles y estables.

Adicionando peróxido se logra aumentar significativamente el porcentaje de reducción de cianuro. Se obtiene un excelente porcentaje de reducción, partiendo de una concentración inicial de cianuro de 400 partes por millón (ppm) mediante el proceso se llega a una concentración final 10,68 ppm, la cual sigue estando por encima del valor establecido por la legislación nacional de 1 ppm de CN^- , para vertimientos a alcantarillado público y/o a un cuerpo de agua. Se sugiere un tratamiento biológico (Castro y Pineda, 2004).

Los peróxidos se utilizan ampliamente para el tratamiento de cianuro en el proceso de aguas residuales. Cuando está bajo condiciones alcalinas, el cianuro se oxida a cianato el cual es mucho menos tóxico. Los peróxidos utilizados pueden ser el peróxido de hidrógeno, percarbonato de sodio y el ácido de Caro, también llamado ácido peroximonosulfúrico o ácido persulfúrico (H_2SO_5). El cianato formado se hidroliza poco a poco a amoníaco y bicarbonato. Estas aguas tratadas con

peróxido de hidrógeno pueden ser descargadas de forma segura después de haber eliminado el amoníaco en caso necesario a través de la recuperación de amoníaco o mediante nitrificación biológica (Tabla 4).



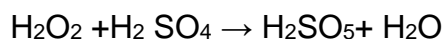
El uso de peróxido de hidrógeno para el tratamiento de los residuos altamente concentrados con cianuro es muy eficaz (varios miles de ppm reducidos a menos de 100 ppm). La tasa de eliminación del cianuro con peróxido de hidrógeno varía de horas a minutos, dependiendo de la naturaleza del cianuro (si esta acomplexado o libre), las condiciones de tratamiento (pH y temperatura) y la presencia de otros componentes en las aguas residuales (Figura 4).

En la mayoría de los casos, la velocidad de reacción y el grado de eliminación de cianuro puede ser reforzada por la adición de pocos ppm de catalizadores que consisten en sales de metales solubles, como el cobre (5-10 ppm). Es ventajoso trabajar con un pH de 9-10.

En el caso de una mezcla de cianuro / nitritos, es importante tratar primero los efluentes a pH alcalino para eliminar los cianuros, antes de reducir el pH para eliminar los Nitritos. Esto reduce el riesgo de generación de ácido cianhídrico en el ambiente.

Eliminación de Cianuros con Acido de Caro

El ácido de Caro (ácido peroximonosulfúrico o ácido persulfúrico), que combina ácido sulfúrico con peróxido de hidrógeno para formar H_2SO_5 .



Este ácido también se emplea como agente oxidante para descomponer el cianuro en solución.

El ácido de Caro es una alternativa al peróxido de hidrógeno catalizado por metales cuando las concentraciones de cianuros son bajas o cuando éste se encuentra complejoado con otros metales. Su rapidez es muy superior al peróxido, por lo que es posible utilizarlo para los “slurries” generados en la extracción de oro y plata, antes de que éstos lleguen a la laguna de descarga. Debido a que este Acido de Caro es más estable que el peróxido de hidrógeno en presencia de determinados metales de transición y en condiciones de elevada temperatura, es referido al peróxido de hidrógeno en aplicaciones de galvanoplastia o metalúrgicas. Para evitar las emisiones de tóxicos de cianuro de hidrógeno, el tratamiento con ácido de Caro se realiza en conjunción con la adición de álcali para mantener un pH alto.

El percarbonato de Sodio también puede ser empleado en la eliminación de los cianuros. Esto es particularmente útil para el tratamiento de emergencia.

Los efluentes de coque o “*cocking*” contienen un cóctel de productos químicos difíciles de tratar como fenoles, sulfuros y tiocianatos. Los tiocianatos en condiciones alcalinas se oxidan a cianato y a sulfato a partir del peróxido de hidrógeno (Tabla 4).



Adición de Cloro

La clorinación es un proceso químico que consiste en la oxidación y destrucción de cianuro libre y los complejos de cianuro débiles bajo condiciones alcalinas (pH = 10,5-11,5). El cloro se suministra en forma gaseosa a aguas residuales de elevado pH o de forma líquida como hipoclorito de sodio. Las formas sólidas se preparan en soluciones concentradas de hipoclorito de calcio previamente a usarse en el proceso de oxidación. El cloro o el hipoclorito pueden también generarse *in situ* electrolíticamente (Gaviria, 2006). Sus principales desventajas son: la formación de cloruro de cianógeno (gas altamente tóxico), formación de lodos y no todas las especies de cianuro son oxidadas (Tabla 4).

Tratamientos Electroquímicos

La electrolisis provoca un cambio químico en un líquido por intervención de la energía eléctrica. Esta energía se introduce mediante la aplicación de una diferencia de potencial entre dos elementos conductores (electrodos) insertos en el

líquido. El líquido en el que se provoca la reacción química debe ser conductor y contener sustancias capaces de oxidarse y/o reducirse. La diferencia de potencial genera un paso neto de corriente eléctrica (electrones) entre los electrodos, con la consiguiente oxidación de algunas especies en la superficie de uno de los electrodos (ánodo) y la reducción de otras en el otro (cátodo) (Cañizares *et al.*, 2004).

Los tratamientos electroquímicos son convenientes cuando la concentración de cianuro es elevada y consiste en la oxidación del cianuro en el ánodo; el problema de este método es la baja conductividad que presentan algunas aguas residuales que contienen cianuro.

4.2.3.2 Tratamiento por oxidación biológica del cianuro

En este tipo de degradación se emplean organismos (plantas, levaduras, hongos o bacterias) existentes en el medio, los cuales convierten o descomponen a los cianuros libres y complejos en formas menos tóxicas para el medio ambiente y la salud humana. Estos microorganismos obtienen de la sustancia contaminante la fuente de nitrógeno necesario para el crecimiento de sus células y una fuente de energía para llevar a cabo todas sus funciones metabólicas (Marloto y Rogel, 2004).

El uso de microorganismos provee de algunas ventajas que son: la destrucción de todas las formas de cianuro y no se da inhibición en la degradación

por la presencia de metales pesados (Akcil, 2003; Smith *et al.*, 1991; Yurramendi *et al.*, 1994).

Las condiciones aeróbicas son mucho más favorables para la degradación del cianuro que las condiciones anaeróbicas, aunque los organismos anaeróbicos pueden ser eficaces para tratar el cianuro en concentraciones de hasta varios miligramos por litro.

Las bacterias utilizan el oxígeno del aire para descomponer los compuestos de cianuro en nitratos, bicarbonatos y sulfatos. Este proceso microbiano es capaz de oxidar los complejos de cianuro metálico, los iones metálicos de las especies de cianuro DAD y los subproductos intermedios de la oxidación del cianuro.

Las ventajas del proceso de tratamiento biológico son:

1. Su diseño simple o escasa infraestructura
2. Alta eficiencia
3. No utilización ni generación de compuestos tóxicos
4. Posibilidad de tratamiento *in situ* y el control del proceso operativo.
5. Los bajos costos y la capacidad para tratar todas las formas del cianuro y sus subproductos.
6. Las posibles limitaciones de los sistemas de tratamiento biológico son su reducido rendimiento con temperaturas frías y con concentraciones muy altas de cianuro.

El fundamento bioquímico de la biodegradación se basa en que en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, se van a producir una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía. La cadena la inicia un sustrato orgánico que es externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia (Marloto y Rogel, 2004).

4.2.4 FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN

- **Temperatura y humedad del suelo**, estimulan el crecimiento y la actividad de los microorganismos aerobios, que necesitan oxígeno para vivir.

- **La acidez del medio**, el pH ácido limita la capacidad de desarrollo de los microorganismos.

- **La disponibilidad de oxígeno**, hay sustancias como el aceite que no se degrada en un medio anaerobio. Por otro lado, hay sustancias como algunos pesticidas y los tóxicos difenilos policloradoso PCBs que sólo se degradan en medios aerobios.

Para realizar la biodegradación es necesario considerar algunas etapas.

- **Caracterizar el Contaminante**: Se deben conocer los parámetros básicos como concentración del contaminante, DBO, DQO, pH y temperatura.

- Selección del Microorganismo: Esta etapa es muy importante ya que cada especie presenta diferentes capacidades para la biodegradación; para la remediación de aguas contaminadas con trazas de cianuro la literatura recomienda emplear *Pseudomonas* (Suh, 1994; Wang *et al.*, 1996).

- Medio de Cultivo: Todos los microorganismos vivos necesitan cierta cantidad de macronutrientes y micronutrientes o trazas de elementos para sobrevivir y realizar todas sus funciones metabólicas.

- Inóculo: Es el proceso que se lleva a cabo para dar inicio a la fermentación.

- Fermentación: Esta etapa es la parte más importante en el proceso de biorremediación (Eweis y Ergas, 1999; White, 2000).

Tanto la actividad natural como la humana contribuyen a la contaminación orgánica de las aguas naturales; es así como, en los vertimientos industriales y domésticos se obtienen múltiples compuestos orgánicos que pueden llegar a deteriorar el medio ambiente (Restrepo, 2000).

El empleo de los tratamientos biológicos para su eliminación utiliza en ciertos casos microorganismos aerobios que aprovechan el oxígeno molecular para la conversión de material orgánico en inorgánico (Restrepo, 2000).

Entre los parámetros más comunes para determinar la materia orgánica presente en un cuerpo de agua, se tiene la Demanda Bioquímica de Oxígeno

(DBO₅), la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y el Carbono Orgánico Total (COT) (Restrepo, 2000).

Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)

La Demanda Bioquímica de Oxígeno se define como la cantidad de oxígeno requerido por las bacterias en el proceso de estabilización de la materia orgánica; es una medida que permite establecer la biodegradabilidad del agua contaminada y por lo tanto sirve como control en el proceso de tratamiento biológico (Restrepo, 2000).

Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Mide la capacidad de consumo de un oxidante químico (dicromato o permanganato) por las materias oxidables contenidas en el agua y se expresa en ppm de O₂ (Restrepo, 2000).

Destrucción Biológica

La degradación biológica de cianuro aprovecha de la capacidad de ciertos grupos de microorganismos, mayormente bacterias, de utilizar compuestos cianurados como fuente de carbono y nitrógeno convirtiendo el compuesto tóxico en sustancias inocuas (Guerrero *et al.*, 2002).

Entre los microorganismos se conoce de la capacidad degradadora de muchos hongos (*Fusarium*, *Hasenula*) y bacterias (*E.coli*, *Pseudomonas*

fluorescens, *Citrobacter*, *Bacillus subtilis* y otros) quienes asimilan cianuro y lo usan como fuente de nitrógeno y/o carbono, teniendo como intermediario amonio. Los microorganismos involucrados poseen varios sistemas enzimáticos específicos que les permite desarrollar en ambientes con alta concentración de cianuro (Tabla 5) (Guerrero *et al.*, 2002).

Son diversos los mecanismos empleados para romper la molécula de cianuro. Uno de los mecanismos involucra a la enzima cianuro hidratasa, que resulta en la conversión irreversible del cianuro en formamida, o en cianoalanina o en un aminonitrilo por la cianoalanina sintetasa que finalmente es transformada en CO_2 y NH_3 (Guerrero *et al.*, 2002).

Otra ruta involucra la utilización de la enzima cianuro monoxigenasa para catalizar la conversión de cianuro de hidrógeno (HCN) en cianato (HOCN), lo que lleva a una descomposición catalítica mediada por otra enzima, cianasa, para producir monóxido de carbono CO y NH. La cianasa es inducible con el cianato mientras que la enzima cianuro monoxigenasa no lo es (Guerrero *et al.*, 2002).

Algunas cepas bacterianas transforman directamente cianuro en CO y NH por medio de la enzima cianuro dioxigenasa, sin la formación de cianato como intermediario (Guerrero *et al.*, 2002).

4.2.5 ENSAYOS REALIZADOS EN BIODEGRADACIÓN Y ASIMILACIÓN DEL CIANURO Y SUS DERIVADOS POR *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 Y *Pseudomonas fluorescens*

Los organismos cianotróficos poseen una ruta degradativa de cianuro y diversos mecanismos de resistencia, como oxidasas alternativas, defensas antioxidantes y sideróforos para la captación de hierro, ya que hierro y cianuro forman complejos estables. La cepa alcalófila *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 utiliza cianato, cianuro libre o en forma de complejos cianometálicos, nitrilos y otros cianoderivados como fuente de nitrógeno; al utilizar el cianuro a pH alcalino favorece su asimilación y evita su volatilización como ácido cianhídrico HCN. Estudios proteómicos indican que el cianuro induce una respuesta compleja en la que participan proteínas relacionadas con la adquisición de hierro, el estrés oxidativo y la disponibilidad de nitrógeno. La degradación de cianuro requiere la producción de oxalacetato y su cianhidrina, que es posteriormente metabolizada por una nitrilasa o nitrilo hidratasa-amidasa formando amonio. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* es un excelente organismo para ser utilizado en la biodegradación de los residuos cianurados (Luque *et al.*, 2004).

La bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 fue aislada a partir de lodos contaminados mediante cultivos sucesivos en medio minimal a pH 9,5 con acetato como única fuente de carbono y NaCN 2mM como única fuente de nitrógeno. La naturaleza alcalófila de esta bacteria autóctona, crece a pH 9,5 pero tolera hasta pH 12, es una característica de gran importancia ya que minimiza la posible volatilización del cianuro como ácido cianhídrico (pKa 9,2). Esta cepa

bacteriana también puede utilizar como fuente de nitrógeno complejos estables de cianuro-metal (ferro y ferricianuro), nitrilos (3-cianoalanina) y cianato (Luque, 2005).

Esta cepa bacteriana al ser cultivada con cianuro, acumula intracelularmente, durante la cianotrofia, gránulos de polihidroxialcanoatos, polímeros que se utilizan para la fabricación de plásticos biodegradables (Luque, 2005).

Rutas degradativas

A continuación se describe las rutas de degradación de cianuro (Figura 5).

El estudio del proteoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 cultivada en cianuro ha permitido identificar proteínas relacionadas con resistencia a cianuro, biosíntesis de sideróforos y estrés general (Huertas *et al.*, 2009).

Se han identificado cinco de estas proteínas denominadas: CN0, CN1, CN2, CN3 y CN4 (Huertas *et al.*, 2009).

La proteína CN0 presenta una masa molecular de 18 kDa. Debido a que *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 crece en presencia de ferrocianuro férrico, como única fuente de nitrógeno y de hierro, y debe producir sideróforos, esta proteína CN0 podría estar implicada en la respuesta a la limitación de hierro en medios con cianuro. Se ha medido la actividad en células de la cepa CECT5344 cultivadas en cianuro y amonio y se ha encontrado un 41% más de actividad en las

primeras con respecto a las cultivadas en amonio. Estos resultados nos permiten proponer que el cianuro induce una formiltransferasa implicada en la síntesis de sideróforos (Huertas *et al.*, 2009).

La proteína CN3 presenta una masa molecular de 16,8 kDa, esta proteína aparece desregulada en medios con cianuro, lo que implica que en ellos existen condiciones de demanda de nitrógeno. En el género *Pseudomonas*, la enzima glutamina sintetasa (GS) se regula por un mecanismo de adenilación/desadenilación que depende del suministro de nitrógeno. Si hay un exceso de carbono (hambre de nitrógeno) la enzima aparece desadenilada y, por lo tanto, activa y en el caso contrario, por exceso de fuente de nitrógeno, aparecería adenilada o inactiva (Huertas *et al.*, 2009).

La proteína CN1 presenta una masa molecular de 28 kDa, y una huella de masa peptídica (PMF) similar a la subunidad c de la alquil hidroperóxido reductasa (AHR) de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. La enzima AHR está implicada en la degradación de H₂O₂ y peróxidos orgánicos que se generan en la cadena respiratoria. Así, la inducción de una enzima de este tipo en células cultivadas en presencia de cianuro nos hace pensar en la posibilidad de un estrés respiratorio causado por el cianuro debido a la inactivación de la citocromo oxidasa. El papel de esta enzima se pone de manifiesto cuando se incuban las células en presencia de hidroperóxido de cumeno, que se utiliza para medir la actividad de esta enzima *in vivo*. El cumeno inhibe totalmente el crecimiento de la cepa cuando no hay cianuro en el medio y parcialmente cuando el cianuro está presente, lo que sugiere una protección por la presencia de esta actividad AHR (Huertas *et al.*, 2009).

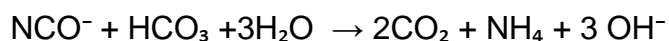
La proteína CN2 presenta una masa molecular de 20 kDa, esta proteína, igual que la enzima alquil hidroperóxido reductasa (AHR), se ha propuesto que protege de la presencia de especies reactivas de oxígeno. Nuestros resultados muestran que el cianuro causa una situación de estrés oxidativo que lleva a la expresión de proteínas implicadas en este tipo de respuesta (Huertas *et al.*, 2009).

El estrés respiratorio causado por la presencia de cianuro puede ser el responsable de la inducción de otra proteína la CN4, que aparece en la membrana de células incubadas en medio rico y en presencia de cianuro. Esta proteína presenta una masa molecular de 18 kDa, un pH de 6,0 y una huella de masa peptídica (PMF) con similitud a proteínas de choque térmico de *Pseudomonas alcaligenes* (Huertas *et al.*, 2009).

Evaluando los resultados obtenidos en el estudio preliminar del proteoma de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 podemos concluir que esta bacteria alcalófila responde a la toxicidad del cianuro induciendo proteínas relacionadas con la biosíntesis de sideróforos, la regulación de la ruta de asimilación de nitrógeno y la reparación y protección frente a estrés oxidativo (Figura 6) (Huertas *et al.*, 2009).

Degradación del cianato

La enzima cianasa que cataliza la bicarbonatolisis de cianato a amonio y CO₂, posibilita la utilización de este compuesto como fuente de nitrógeno (Figura 7) (Huertas *et al.*, 2009).



El crecimiento de esta cepa con cianato induce una actividad cianasa que produce CO_2 y NH_4^+ . El gen *cynS*, implicado en la degradación del cianato en *P. pseudoalcaligenes*, que codifica la cianasa se contrascribe con los genes *cynABD* que codifican, los componentes de un transportador aniónico que podría mediar la entrada de cianato o bicarbonato, el otro sustrato de la cianasa, al interior celular. La actividad cianasa de la cepa también se induce en presencia de cianuro, pero la existencia de una posible ruta oxidativa de degradación de cianuro con cianato como intermediario no parece probable porque no se ha detectado la actividad cianuro monooxigenasa que formaría cianato a partir de cianuro y, sobre todo, porque una mutación en el gen *cynS* determina la pérdida de la capacidad para crecer con cianato pero no afecta al crecimiento ni al consumo de cianuro, que son similares en las cepas silvestres y mutante (Huertas *et al.*, 2009). Por lo tanto, la cianasa es una enzima que, aunque se induce por cianuro, sólo participa en la degradación de cianato.

P. pseudoalcaligenes CECT5344 crece con 3-cianoalanina y con las cianhidrinas (2-hidroxinitrilos) del piruvato, 2-oxoglutarato y oxalacetato. Estas cianhidrinas se pueden sintetizar químicamente en presencia de cianuro, la formación de la cianhidrina del piruvato se favorece a pH neutro, las cianhidrinas del 2-oxoglutarato y del oxalacetato se forman a pH alcalino (8,5 -9,5). La degradación de estos nitrilos puede realizarse en un solo paso catalizado por una nitrilasa que genera amonio, pero en dos reacciones sucesivas que requieren las enzimas nitrilo hidratasa y amidasa. También se ha comprobado que el cianuro y

los residuos industriales cianurados inducen la acumulación de oxalacetato y la aparición de una actividad nitrilasa que podría ser responsable del crecimiento (Luque, 2005).

El mutante RC5 tolera y degrada altas concentraciones de cianuro, acumula oxalacetato de forma constitutiva y en mayor cantidad que la cepa silvestre, lo que confirma el papel del oxalacetato y su cianhidrina como intermediarios de la ruta de degradación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes*. Se ha comprobado que las actividades de las enzimas citrato sintasa e isocitrato liasa en las células que crecen con cianuro son muy superiores a las observadas en cultivos con amonio, nitrato o sin fuente de nitrógeno. Así la actividad citrato sintasa en presencia de cianuro es 2 veces superior a la que poseen las células cultivadas con amonio o nitrato (y 34 veces mayor que en limitación de nitrógeno), mientras que la actividad de la principal enzima del ciclo del glioxilato, la isocitrato liasa, en presencia de cianuro es 5 veces superior que en células cultivadas con amonio y 20-25 veces superior que con nitrato o sin fuente de nitrógeno. Estos resultados sugieren que el ciclo del glioxilato es una de las principales vías de producción del oxalacetato acumulado durante la asimilación de cianuro (Figura 6) (Luque, 2005).

Otra alternativa alternativa biotecnológica de degradar cianuro es empleando una cepa nativa de *P. fluorescens*, aislada a partir de muestras de arenas o colas procedentes de plantas de beneficio de oro que utilizan la cianuración como proceso de beneficio del material acuífero, estas arenas cianuradas, contienen concentraciones de cianuro ambientalmente inaceptables (directamente al suelo o a pequeñas corrientes de agua). El impacto de las descargas varía entre los

entables dependiendo de la técnica usada en la cianuración (percolación o agitación), del tamaño de la planta, de las cantidades de cianuro utilizadas (25 a 300 Kg de NaCN/mes) y del control que se haga del proceso (cantidad de NaCN que reacciona y cantidad residual) (Restrepo *et al.*, 2006).

Las *Pseudomonas fluorescens*, son bacilos Gram negativos, rectos o curvados no vibriodes sin esporas, vainas, ni apéndices, con flagelos polares, pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae*; son organismos aerobios órganotróficos sin metabolismo fermentativo, aunque pueden producir pequeñas cantidades de ácido procedente de la glucosa. Su diámetro se encuentra entre 0,7-0,8 μm .

La *Pseudomonas fluorescens* se encuentra involucrada en algunos procesos de infección, casi siempre como agente oportunista, se suele aislar como patógeno en pacientes cuyas defensas se encuentran comprometidas. La Tabla 6 muestra algunas características generales de la *Pseudomonas fluorescens* (Córdoba, 2000).

Crece quimioorganotróficamente, es decir, son organismos que dependen de reacciones de óxido reducción para obtener energía y utilizan sustancias oxidables a pH neutro o básico. Se reproducen a temperaturas mesófilas (entre 25 y 30 °C); son organismos que presentan gran capacidad para utilizar una diversidad de nutrientes como donadores y aceptores de éstos, haciéndolos nutricionalmente muy sencillos y permitiéndoles una amplia distribución en la naturaleza. Arrojan

resultados positivos en pruebas bioquímicas como Oxidasa y Catalasa (Mac Faddin, 1980).

Su versatilidad nutricional y por lo tanto su dotación enzimática, hace de estas bacterias un grupo importante ecológicamente, dado que son probablemente responsables de la degradación aeróbica de muchos compuestos en los diferentes ecosistemas, algunos de ellos tóxicos para otros organismos acompañantes (Mac Faddin, 1980).

Después de haber obtenido varias cepas nativas de cada planta de beneficio se seleccionó una de ellas por su mayor velocidad de crecimiento y se tomaron inóculos microbianos de 48 horas de crecimiento y se diluyeron hasta 10^{-4} en caldo peptonado. De esta última dilución se tomó 1ml y se inoculó en 100 ml de solución de NaCN con concentraciones de 100 hasta 1000 ppm de cianuro. A los cultivos bacterianos se les proporcionó las condiciones de temperatura, oxigenación y humedad óptimas. Todos los experimentos se desarrollaron durante 236 horas (Figuras 9 y 10) (Restrepo *et al.*, 2006).

Biodegradación de Cianuro

Según los datos obtenidos en los experimentos de biodegradación de cianuro, se observó que en las primeras 24 horas, el reactor con la mínima cantidad de contaminante se redujo en un 60%, mientras que doblando la concentración en el segundo reactor, sólo se obtuvo un 14% de degradación. Los reactores con 400 y 500 ppm de cianuro si se biodegradaron en un 50% aproximadamente. Las

demás concentraciones se mantuvieron altas durante el mismo tiempo. Para el segundo día del proceso, todos los reactores se mantuvieron en la misma concentración del día anterior. A partir del día 3 de los experimentos, se comenzó a notar una caída muy significativa en la concentración de cianuro en reactores con concentraciones inferiores a 800 ppm de NaCN (Restrepo *et al.*, 2006).

Las concentraciones de 800 y 900 ppm de cianuro fueron degradadas en un muy bajo porcentaje, mientras que a una concentración de 1000 ppm, no hubo respuesta de la especie bacteriana (Figura 11) (Restrepo *et al.*, 2006).

4.3 BACTERIAS Y MOHOS REDUCTORES DE CROMO (VI) PRESENTES EN RAÍCES DE PLANTAS ACUÁTICAS

El cromo (Cr) es un metal de transición del grupo VI – B de la tabla periódica, cuyas especies más estables y abundantes son la trivalente, Cr (III), y la hexavalente, Cr (VI). El Cr (VI) se encuentra comúnmente en forma hidrosoluble [cromatos (CrO_4^{2-}) y dicromatos ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$)], mientras que el Cr (III) en forma de óxidos, hidróxidos o sulfatos es mucho menos móvil y existe unido a materia orgánica en el suelo y en ambientes acuáticos. El Cr (VI) es un fuerte agente oxidante y en presencia de materia orgánica es reducido a Cr (III). Sin embargo, niveles elevados de Cr (VI) pueden sobrepasar la capacidad reductora del ambiente y puede así persistir como un contaminante. Diversos compuestos de cromo son contaminantes ambientales presentes en agua, suelos y efluentes de industrias, debido a que dicho metal es ampliamente utilizado en distintas actividades manufactureras, tales como cromado electrolítico, fabricación de explosivos, curtido

de pieles, aleación de metales, fabricación de colorantes y pigmentos, etc. (McGrath y Smith, 1990).

4.3.1 TOXICIDAD DEL CROMO

El cromo hexavalente se clasifica como contaminante primario debido a su movilidad y a sus efectos nocivos sobre los organismos vivos. Los efectos biológicos del Cr dependen de su estado de oxidación. El Cr (VI) es considerado la forma más tóxica del metal, debido a que atraviesa fácilmente las membranas biológicas y puede ser transportado activamente al interior de las células por medio del transportador de sulfato (Borst y Pauwels, 1981); debido a su analogía química con el sulfato, el cromato es un inhibidor competitivo del transporte de aquel ion esencial. El Cr (VI) es altamente tóxico para todas las formas de vida, siendo mutagénico y carcinogénico en humanos y mutagénico en bacterias (Losi *et al.*, 1994).

La toxicidad del Cr (VI) se debe a que éste, al igual que otros metales, genera estrés oxidativo; en este proceso dentro de las células se generan intermediarios reducidos de cromo que, en presencia de H_2O_2 , funcionan como catalizadores de una reacción tipo Fenton, llevando a la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO). Esto acarrea el consecuente daño oxidativo, produciendo peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y daños a los ácidos nucleicos (Ercal *et al.*, 2001; Liu y Shi, 2001).

Por otra parte, el Cr (III) es relativamente inocuo debido a su insolubilidad e incapacidad para atravesar las membranas biológicas; dicha especie constituye un oligoelemento indispensable para procesos bioquímicos y fisiológicos en células superiores. El Cr (III) específicamente tiene acciones en el metabolismo de la glucosa, el colesterol y los ácidos grasos, además de desempeñar un papel importante en diferentes reacciones enzimáticas (ATSDR, 2000).

4.3.2 INTERACCIONES MICROBIANAS CON EL CROMATO

Las bacterias y los hongos son organismos que poseen propiedades fundamentales como bioconvertidores y juegan un papel importante en los ciclos geoquímicos de los metales (Ehrlich, 1997). La influencia negativa de la acumulación del cromo sobre las poblaciones de microorganismos del suelo ha sido ampliamente descrita, así como la consecuente aparición de poblaciones de organismos adaptados (resistentes) al ambiente hostil (Cervantes *et al.*, 2008).

Las células microbianas interactúan con el cromo a diferentes niveles, desde la pared celular, el periplasma y la membrana plasmática, hasta el citoplasma y los organelos celulares (en el caso de los hongos). Los microorganismos requieren detectar y regular los niveles intracelulares de cromo a través de sistemas de homeostasis que mantienen un balance entre la incorporación, expulsión y atrapamiento del ión.

Es común que los microorganismos nativos de sitios contaminados con cromo muestren resistencia al ión, debido a que poseen mecanismos activos o

pasivos que les permiten removerlo o destoxificarlo. En ciertas especies se conocen con detalle dichos mecanismos, algunos de los cuales son de interés básico y de importancia biotecnológica, esto último en el contexto del desarrollo de nuevas tecnologías para el tratamiento de efluentes industriales y para la Biorremediación de sitios contaminados. De manera general dichos mecanismos comprenden: Los sistemas de transporte e incorporación (bioacumulación); la interacción y unión con componentes de la superficie celular (biosorción); y la transformación química (reducción).

4.3.2.1 Transporte y acumulación de cromo (bioacumulación)

La incorporación de cromato a través del transportador de sulfato ha sido demostrada en varios tipos de bacterias como *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Alcaligenes eutrophus*; la alteración en la función de dicho transportador causa el fenotipo de resistencia a cromato (Cervantes *et al.*, 2008). Adicionalmente, en algunos géneros de bacterias se ha descrito la existencia de determinantes genéticos de resistencia a cromato presentes en plásmidos, los cuales codifican transportadores de membrana que dirigen el flujo de iones cromato del citoplasma de la célula al exterior. Ejemplo de esto lo constituye la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa* y de *Cupriavidus metallidurans*, la cual funciona como una bomba expulsora de cromato (Cervantes y Campos, 2007; Ramirez *et al.*, 2008). Se ha indicado que las proteínas ChrA forman parte de la superfamilia de transportadores CHR, probablemente implicadas en el transporte de sulfato y cromato (Nies *et al.*, 1998). Las bases de datos de la familia de proteínas CHR actualmente incluyen 135 secuencias de homólogos,

incluyendo proteínas de origen eucariótico, entre ellas de algunos hongos filamentosos (Cervantes y Campos, 2007); con la excepción de las proteínas de *P. aeruginosa* y *C. metallidurans*, la función de otras proteínas CHR homólogas no ha sido analizada en detalle.

En el caso de los hongos, se ha descrito que en levaduras el Cr (VI) puede incorporarse a las células por un transportador aniónico no específico, un sistema de permeasas que transporta diferentes aniones como sulfatos y fosfatos. Evidencia adicional en este sentido se obtuvo por la observación de que algunos mutantes resistentes a cromo de hongos filamentosos y levaduras mostraron una dramática disminución en el transporte de sulfato (Cervantes *et al.*, 2008). Como se mencionó líneas arriba, recientemente se ha indicado (Cervantes y Campos, 2007) que en el genoma de algunos hongos filamentosos existen genes codificantes de proteínas CHR, cuya función no ha sido analizada experimentalmente.

4.3.2.2 Interacción y unión con componentes de la superficie celular (Biosorción)

Debido a su naturaleza de oxianión, el Cr (VI) no es atrapado por los componentes aniónicos de las envolturas bacterianas (Holan y Volesky, 1995); sin embargo, derivados catiónicos de Cr (III) se unen fuertemente con lipopolisacáridos de *Salmonella*, con paredes celulares de *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* y con polímeros capsulares de *Bacillus licheniformis* (Cervantes *et al.*, 2008). En el caso de los hongos, también se ha descrito el atrapamiento del cromo en la superficie

celular, como resultado de su unión con componentes de la pared celular, como quitina y quitosana (Cervantes *et al.*, 2008).

En los casos mencionados, la unión del cromo a la superficie microbiana ocurre de un modo independiente de energía, de manera similar a lo descrito con otros metales y se le ha denominado biosorción (Cervantes *et al.*, 2008).

4.3.2.3 Transformación Química (Reducción)

Un amplio rango de bacterias ha sido identificado como capaz de llevar a cabo la reducción completa de Cr(VI) a Cr(III), por reacciones de oxidación – reducción de naturaleza biótica o abiótica (Ramírez *et al.*, 2008). Este proceso puede ser considerado como un mecanismo adicional de resistencia a cromato en bacterias, el cual no es usualmente codificado en plásmidos (Cervantes *et al.*, 2008). Se han descrito tres mecanismos de reducción de Cr (VI) (Ramírez *et al.* 2008): i) En condiciones aeróbicas, la reducción de Cr (VI) ha sido asociada con cromato reductasas que usan NADH o NADPH como cofactores. ii) En la reducción en condiciones de anaerobiosis, el Cr (VI) es usado como aceptor de electrones en la cadena transportadora de electrones; iii) La reducción puede también llevarse a cabo por reacciones químicas asociadas con compuestos como aminoácidos, nucleótidos, azúcares, vitaminas, ácidos orgánicos o glutatión.

Asociados a las raíces de macrófitas acuáticas pueden encontrarse microorganismos que reducen el Cromo (VI) a cromo III es decir lo hace inocuo. Se

ha sugerido que esta reducción es un mecanismo de resistencia adicional al cromato codificado en el material genético.

Algunas bacterias tienen la capacidad de reducir Cr (VI) en aerobiosis, por ejemplo: *P. putida*, *P. ambigua*, *E. coli*, *Bacillus* sp, *P. fluorescens*, *Enterobacter cloacae*, descrita como resistente al cromato, es el ejemplo más estudiado de bacteria que reduce el Cr (VI). *Bacillus* sp. QC1-2, especie aislada en zonas contaminadas con Cr, tiene la capacidad de ser tolerante al cromato y de reducir el Cr (VI) a Cr (III). Se han identificado bacterias, como *Pseudomonas ambigua* G1, de las cuales se ha purificado la Cr reductasa NADPH-dependiente, la cual es la responsable de la reducción de Cr (VI) a Cr (III) (Cervantes *et al.*, 2008).

4.3.3 REDUCCIÓN ENZIMÁTICA DE CROMO (VI)

En este caso la reducción puede deberse a enzimas de membrana o de la fracción soluble, y puede ocurrir bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Cervantes y Campos, 2007). Las reductasas descritas incluyen: a) Enzimas membranales de *Pseudomonas putida* que transfieren electrones al Cr(VI) por citocromos dependientes de NADH; b) Las NADH:flavín oxidoreductasas de *Enterobacter cloacae* que usan al Cr (VI) como aceptor de electrones; c) La nitroreductasa de *Vibrio harveyi*, que posee una actividad primaria como nitrofurazona nitrorreductasa y una función secundaria como reductasa de Cr (VI); d) La reductasa férrica de *Paracoccus denitrificans*, que usa Fe(III) - nitrilotriacetato y Cr (VI) como sustratos.

La proteína ChrR de *P. putida* es la reductasa de Cr (VI) mejor estudiada; esta enzima une FMN y muestra actividad de reductasa dependiente de NADH. Esta proteína, además de reducir Cr (VI), también reduce ferricianuro. Estudios con mutantes indicaron que la enzima ChrR protege contra la toxicidad de cromato, posiblemente debido a que previene la reducción de Cr (VI) por reductores celulares de un electrón, minimizando así la generación de especies reactivas de oxígeno. Durante la reducción de Cr (VI) la proteína ChrR muestra actividad de quinona reductasa generando una flavín semiquinona; por esta reacción la enzima transfiere alrededor del 25% de los electrones del NADH al anión superóxido, de modo que en una ruta la enzima reduce el Cr (VI) a Cr (III), generando Cr (V) como intermediario y el anión superóxido, y por un mecanismo adicional reduce las quinonas, lo cual provee de un mecanismo de protección contra las especies reactivas de oxígeno.

La proteína ChrR de *P. putida* es miembro de la familia de proteínas FMN reductasas dependientes de NAD (P) H (Finn *et al.*, 2006), la cual es parte del clan de flavoproteínas que incluye proteínas redox que unen FMN o FAD (Finn *et al.*, 2006).

La reductasa YieF de *E. coli* muestra homología de secuencia con la proteína ChrR de *P. putida*; la enzima tiene un amplio rango de sustratos y, además de Cr (VI), puede reducir ferricianuro, vanadio (V), molibdeno (VI), varias quinonas y 2,6-dicloroindofenol (Ackerley *et al.*, 2004). La acción de la proteína YieF involucra una reducción obligatoria del Cr (VI) de cuatro electrones, en la cual la enzima transfiere simultáneamente tres electrones al Cr (VI) para producir Cr (III) y un electrón al

oxígeno molecular generando así especies reactivas de oxígeno; en este proceso no se generan lavín semiquinonas (Ackerley *et al.*, 2004). De este modo, la proteína YieF proporciona a *E. coli* un mecanismo efectivo de protección contra la toxicidad del cromato, formando una cantidad más baja de especies reactivas de oxígeno.

En la bacteria *Thermus scotoduct us SA-01*, existe una cromato reductasa altamente eficiente, relacionada con reductasas xenobióticas involucradas en la respuesta a estrés oxidativo (Opperman *et al.* 2008).

En conclusión, la reducción de Cr (VI) parece ser un eficiente sistema de resistencia a cromato en bacterias; sin embargo, el uso por las cromato reductasas de sustratos alternativos, además de Cr (VI), sugiere que esta actividad reductora ha sido un mecanismo adaptativo promovido por la reciente exposición a cromato.

Los reportes sobre hongos con capacidad de reducir el Cr (VI) son escasos; dichos organismos incluyen levaduras como *Candida utilis* (Muter *et al.*, 2001), *Candida maltosa* (Ramírez y Ramírez *et al.*, 2004) y una cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* (Ksheminska *et al.*, 2006), y hongos filamentosos como las cepas Ed8 de *Aspergillus* sp y H13 de *Penicillium* sp (Acevedo *et al.*, 2006). Los aislados mencionados de *Aspergillus* sp y *Penicillium* sp fueron obtenidos de suelo contaminado con cromato y son capaces de crecer en altas concentraciones del ión. Las dos cepas poseen la capacidad de reducir eficientemente el Cr (VI) a Cr (III) lo cual ocurre con muy poca unión (< 1%) a la biomasa del cromo total presente en el medio; esto indica que dicha transformación ocurre en el exterior de las células (Acevedo *et al.*, 2006). Estudios moleculares y morfofisiológicos permitieron la

identificación de la cepa Ed8 como un aislado de *Aspergillus niger* var. *tubingensis*. A diferencia de una cepa de colección de *A. niger*, la cepa Ed8 muestra resistencia a Cr (VI), aunque ambas poseen capacidad de reducción del ión y pueden crecer en medio con baja concentración de sulfato (Acevedo *et al.*, 2006).

El hongo Paecilomyces sp., presenta la capacidad de disminuir 50 mg/L de Cr (VI), hasta niveles indetectables en 7 días, con la producción concomitante de Cr (III), sin cambios significativos en los niveles de Cr total en el medio de cultivo sin inóculo (Figura 12.) Lo anterior indica que el hongo es capaz de reducir Cr (VI) a Cr (III) en el medio suplementado con cromato. Se han descrito dos mecanismos por los cuales el cromato puede ser reducido a un estado de oxidación menos tóxico, uno que involucra reacciones enzimáticas (Cárdenas-González y Acosta-Rodríguez, 2011).

El segundo mecanismo por el cual se puede reducir la concentración de cromato es la bioadsorción. Al respecto, 1,0 g de biomasa fúngica es capaz de remover 1000 mg/L de Cr (VI) a 60°C, a las 3 h de incubación (Cárdenas-González y Acosta-Rodríguez, 2011).

La pared celular fúngica tiene diferentes grupos funcionales que pueden formar complejos de coordinación con los metales, lo que puede facilitar la remoción de los mismos en solución (Cárdenas *et al.*, 2010).

En un estudio de biorremediación se inocularon 5×10^5 esporas/ml a 100 ml de Medio Mínimo de Lee LMM por sus siglas en inglés (pH 4.0) incubando a 28°C

por 48 h a 100 rpm; después se añadieron 20 g de tierra no estéril, contaminada con 50 mg Cr (VI)/g de tierra, obtenida de una tina de lavado de una cromadora. Las alícuotas analizadas en diferentes tiempos indicaron que después de 8 días de incubación, disminuye totalmente el metal en solución (Cárdenas *et al.*, 2010).

La capacidad de remoción de Cr (VI) por el hongo, es igual o mejor a las de otras cepas reportadas, como *Candida maltosa* RR1 (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2004). Tal vez, esta cepa fue superior a las otras reportadas, debido a su capacidad de reducir eficientemente Cr (VI) bajo condiciones acídicas. La mayoría de estudios de reducción de Cr (VI) por microorganismos han sido realizados a pH neutro (Ramírez-Ramírez, *et al.*, 2004; Acevedo-Aguilar, *et al.*, 2008).

En otro estudio se utilizaron bacterias reductoras de Cr (VI) no identificadas, nativas de un sitio contaminado, encontrando que la reducción de 50 mg/L de Cr (VI) por las bacterias fue de alrededor de un 80%, con 10 g/L de peptona como fuente de electrones y un tiempo de retención hidráulica de 8 h (Krishna y Philip, 2005).

4.3.4 BIOSORCIÓN DE CROMO

En 1995 se hizo un esfuerzo para resumir el tipo y eficacia de los biosorbentes, así como los procesos de tratamiento por biosorción; desde entonces a la fecha los estudios han continuado de manera intensiva, considerándose el empleo de biomasa bacteriana o fúngica, cultivadas en lote, en biorreactores o

inmovilizadas en diferentes matrices, para remover por biosorción el cromo presente en medio de cultivo o en efluentes industriales (Holan y Volesky, 1995).

Entre las bacterias descritas se incluyen las cianobacterias *Nostoc calcicola* HH-12 y *Chroococcus* sp. HH-11 (Anjana *et al.* 2007), *Acinetobacter* sp. (Shrivastava y Thakur, 2007), *Streptococcus equisimilis*, *Bacillus coagulans* y *E. coli* (Quintelas *et al.*, 2008). Recientemente se ha utilizado una cepa transgénica de *E. coli* que expresa las proteínas atrapadoras de metales MerP de la bacteria Gram-positiva *Bacillus cereus* o de la bacteria Gram-negativa *Pseudomonas* sp.; los estudios indicaron que ambas proteínas mejoran significativamente la biosorción de Cr (III) por *E. coli* (Kao *et al.*, 2008). En algunos casos, se considera el empleo de biopelículas bacterianas soportadas en carbón activado granular (Lameiras, 2008).

Los organismos utilizados incluyen *Aspergillus* sp., e *Hirsutella* sp. (Srivastava y Thakur, 2006), *Rhizopus nigricans* (Abraham y Bai, 2005), *Rhizopus cohnii* (Li *et al.*, 2008), *Trichoderma viride* (Bishnoi *et al.*, 2007), *Penicillium chrysogenum* (Deng *et al.*, 2006) y otros. En algunos casos se ha considerado el empleo de biomasa fúngica generada como residuo de fermentaciones para la producción de alimentos, bebidas o productos farmacéuticos (*P. chrysogenum*, utilizado para la producción de penicilina). En este caso se ha considerado realizar modificaciones a la superficie de la biomasa micelial, mediante la adición de cargas positivas por la inserción en la misma del polímero polietilenimina. Debido a la alta densidad de grupos amino en las moléculas del polímero, la biomasa modificada

mostró potencial zeta positivo así como alta capacidad de adsorber Cr (VI) (Deng *et al.*, 2006).

Otro enfoque novedoso ha consistido en la preparación de microesferas magnéticas biofuncionales para la adsorción y recuperación de Cr (VI); la subsecuente aplicación de la tecnología de separación magnética hace el proceso más conveniente. En este procedimiento, fue utilizado biomasa pulverizada del hongo *Rhizopus cohni* en la preparación de las microesferas; en este caso la biosorción ocurrió en forma de Cr (VI) por efecto de la biomasa fúngica (Li *et al.*, 2008) (Figura 13).

4.4 DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DE COMPUESTOS ORGÁNICOS ARÓMATICOS

La inclusión de compuestos orgánicos naturales y sintéticos (xenobióticos) al medio ambiente, junto a la masiva relocalización de materiales naturales en diferentes ambientes, durante las últimas décadas por acción de actividades humanas, ha resultado en la acumulación de miles de compuestos contaminantes (Garbisu y Alkorta, 1999). Un contaminante de importancia en los impactos que pueda causar al ambiente son los hidrocarburos de petróleo. Todas las actividades que van desde su extracción, procesamiento, transporte hasta su comercialización, generan en algún momento contaminación. Los laboratorios que trabajan en el campo ambiental han generado información sobre la bioquímica, genética y microbiología presentes en eventos de exposición de contaminantes en ambientes en los cuales estos nunca estuvieron presentes (Milcic *et al.*, 2001). El problema de

la contaminación se agrava por la aparición de compuestos que generalmente incluyen enlaces químicos inusuales o sustituciones con halógenos u otros grupos funcionales que hacen a las moléculas altamente resistentes a la degradación por parte de microorganismos (Garbisu y Alkorta, 1999; Cafaro *et al.*, 2002).

El más promisorio avance para remediar ambientes contaminados es la biodegradación, explorando y estudiando las funciones catabólicas de los microorganismos (Furukawa, 2000). La biodegradación llevada a cabo por poblaciones naturales de microorganismos, es la base por medio de la cual miles de compuestos orgánicos, incluyendo el petróleo, pueden ser eliminados del ambiente por biooxidación (Huy *et al.*, 1999). Esta técnica, explota la diversidad genética y metabólica de los microorganismos para transformar los contaminantes en productos finales menos peligrosos (CO_2 , H_2O , etc.) y de tal manera puedan ser integrados en los ciclos bio-geoquímicos naturales (Garbisu y Alkorta, 1999).

Los suelos contaminados son, por lo general, colonizados por diferentes especies que se adaptan a las fuentes de energía presentes en el sitio. Se estima que en un gramo de suelo en condiciones naturales (no afectadas por acciones antropogénicas) se pueden encontrar hasta 600 millones de bacterias, entre las cuales pueden existir entre 15 mil y 20 mil especies distintas, la Tabla 7 presenta las bacterias más representativas del suelo.

En los suelos contaminados con hidrocarburos, las bacterias y hongos capaces de utilizar hidrocarburos representan el 1% de la población total siendo aproximadamente 10^4 a 10^6 células por gramo de suelo, también se han encontrado

cianobacterias y algas capaces de degradar hidrocarburos. Los suelos contaminados con hidrocarburos contienen más microorganismos que los suelos no contaminados, pero su diversidad es más reducida.

La fisiología microbiana es la interfase entre los descubrimientos biológicos y la ingeniería genética por un lado y la biotecnología y bioquímica ambiental y la explotación de la productividad microbiana en el otro. El entendimiento de la genética y bioquímica del metabolismo de los compuestos xenobióticos, constituye un considerable potencial para el desarrollo de microorganismos recombinantes, los que son usados para la degradación de contaminantes ambientales originados por actividades industriales (Haro y V. de Lorenzo, 2001).

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) son un grupo largo y diverso de compuestos formados por anillos aromáticos fusionados, derivados de fuentes endógenas, cuyo origen es el petróleo y actividades antropogénicas (Williansom *et al.*, 2002). Estos compuestos incluyen un grupo de contaminantes orgánicos de importancia ambiental y de salud pública debido a las siguientes características: efectos de salud crónicos, alta recalcitrancia y elevado potencial de bioacumulación (Park *et al.*, 1990).

Se ha estimado que 230.000 toneladas métricas de HPAs entran al ambiente global anualmente debido a derrames y filtraciones de petróleo, descargas directas de fuentes industriales y domésticas, transporte y biosíntesis (Williansom *et al.*, 2002).

Los HPAs pueden ser divididos en cuatro clases: los saturados, aromáticos, asfaltenos y resinas. Los niveles de biodegradación han demostrado ser mayores para los compuestos saturados, seguidos por los aromáticos de alto peso molecular y compuestos polares (Leahy y Colwell, 1990).

El ciclo del carbono es más complejo que cualquier otro, actuando por lo menos en diez millones de compuestos orgánicos. La diversidad de compuestos orgánicos producidos por diagenesis y biosíntesis ha llevado a una presión selectiva que condujo a la evolución de enzimas en bacterias, para que estas puedan usarlos como fuente de carbono (Wackett, 1998).

El estudio de estos compuestos es de alto interés debido a que pueden ser precursores de carcinógenos o mutágenos en la biota terrestre o acuática. Estos contaminantes ingresan al organismo y pueden ser los causantes de cáncer de piel, cerebro y pulmones (Shim *et al.*, 2001; Williamsom *et al.*, 2002).

Los microorganismos debieron adaptarse rápidamente y evolucionar nuevas y novedosas características metabólicas para explotar fuentes de carbono alternativas, o para sanear compuestos tóxicos. En bacterias, una rápida evolución se da gracias a la plasticidad del genoma y a la transferencia génica (Garbisu y Alkorta, 1999; Barbieri *et al.*, 2001). La exposición de poblaciones microbianas a hidrocarburos puede imponer una ventaja selectiva para cepas que tengan plásmidos y codifiquen la producción de enzimas para degradar hidrocarburo. Queda como resultado un incremento en la frecuencia de dichos plásmidos en la comunidad microbiana (Leahy y Colwell, 1990).

Los tres mecanismos relacionados a la adaptación para que estas características pueden ocurrir son: por inducción y/o depresión de enzimas específicas, por cambios genéticos con el resultado de nuevas capacidades metabólicas, y enriquecimiento selectivo de organismos capaces de transformar el compuesto o los compuestos de interés (Leahy y Colwell, 1990). Es bien conocido que la transferencia génica juega un papel crucial en la evolución de las vías degradativas de las bacterias (Barbieri *et al.*, 2001). La amplificación de productos basados en regiones altamente conservadas dentro de genes importantes, permitirán observar y detectar variación y generación de nuevos genotipos (Baldwin *et al.*, 2003).

Alrededor de 30 géneros en 100 especies de microorganismos son capaces de degradar HPAs, muchos de los cuales son bacterias. Los géneros de bacterias Gram negativas más comunes son *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Alcaligenes* y *Acinetobacter*. Los géneros de bacterias Gram positivas corrientes son *Arthrobacter*, *Nocardia* y *Bacillus* (Schaffner *et al.*, 1996). Las poblaciones bacterianas dominantes en estas comunidades poseen características nutricionales relacionadas a los contaminantes, y son también resistentes a muchos tipos de estrés ambiental ocasionado por otros contaminantes. Bajo óptimas condiciones de crecimiento, la abundancia total de microorganismos en los suelos puede exceder las 10⁶ a 10⁸ colonias por gramo (peso seco) de suelo por bacteria (Schaffner *et al.*, 1996).

Las bacterias aeróbicas en el suelo representan entre el 50 y 70% del total de la comunidad microbiana, mientras que las bacterias anaeróbicas, actinomicetes

y micromicetes representan entre el 10%, 20 al 30%, y 1 al 2% respectivamente (Schaffner *et al.*, 1996). Los niveles de degradación de muchos de los contaminantes por parte de comunidades microbianas son proporcionales a la concentración del compuesto, generalmente, conforme a la cinética de Michaelis-Menten. Esta cinética ha sido demostrada para la oxidación y degradación de tolueno, un hidrocarburo de peso molecular bajo y de relativamente alta solubilidad, (Leahy y Colwell, 1990). Muchas de las vías de degradación del tolueno son expresadas en bacterias (Keener *et al.*, 2001).

La mayor parte de las cepas del género *Pseudomonas* crecen en presencia de compuestos aromáticos debido a que tienen sistemas enzimáticos capaces de activar anillos aromáticos por mono y di-hidroxilación (Cafaro *et al.*, 2002).

Desde cuándo se ha estudiado los genes relacionados con degradación de hidrocarburos, se ha visto que estos están localizados en plásmidos (Sotsky *et al.*, 1994). Los plásmidos, secuencias de DNA circular autónomas, juegan un importante papel en la adaptación genética ya que pueden ser transferidos vía conjugación o transformación y logran producir nuevos fenotipos, incluyendo la capacidad de oxidar hidrocarburos (Leahy y Colwell, 1990). De todas las rutas metabólicas codificadas en plásmidos, la transferencia de estos mediante conjugación contribuye altamente a la dispersión de genes catabólicos, incluso entre bacterias que pertenecen a géneros diferentes (Barbieri, *et al.* 2001).

Se ha observado una alta frecuencia de plásmidos (19,4%) en células bacterianas aisladas en sitios con un historial de contaminaciones mediante

hidrocarburos comparando con ambientes prístinos (1,8 y 7,7%), (Leahy y Colwell, 1990). La frecuencia de transposición de los elementos móviles es estimada en 10^{-6} a 10^{-7} (Haro y V. de Lorenzo, 2001).

La adaptación microbiana al ambiente puede ser facilitada por la transferencia de material genético entre comunidades microbianas naturales y dentro de ellas. La transferencia de genes horizontal, es el mayor mecanismo para adquirir rasgos metabólicos en nuevas combinaciones (Stuart-Keil, *et al.*, 1998). La proporción relativa de genes para las vías de degradación de hidrocarburos alifáticos o aromáticos parece reflejar la composición química de los hidrocarburos disponibles y la presión selectiva a la que han sido sometidas las poblaciones bacterianas (Sotsky *et al.*, 1994). Diferentes genes son responsables del metabolismo de los alcanos de bajo peso molecular, alcanos de alto peso molecular, aromáticos de bajo peso molecular y aromáticos polinucleares (Sotsky *et al.*, 1994).

La caracterización de genes involucrados en la degradación bacteriana de compuestos orgánicos ha promovido el desarrollo y aplicación de técnicas moleculares para el estudio de las comunidades bacterianas de los suelos contaminados. Estas técnicas incluyen pruebas del catabolismo de los genes en hibridaciones de ácidos nucleicos, PCR para amplificar secuencias específicas y secuenciación (Milcic-Terzic *et al.*, 2001).

4.4.1 OXIGENASAS

Debido al riesgo ecológico en tierra y agua contaminadas con hidrocarburos, se ha evaluado la habilidad de las oxigenasas para degradar hidrocarburos (Shim y Wood, 2000). Las oxigenasas son enzimas que catalizan la incorporación de uno o dos átomos de oxígeno en un sustrato (monooxigenasas o dioxigenasas respectivamente). Este proceso está entre los más comunes en el metabolismo de químicos endógenos y xenobióticos (Guengerich, 2002). Más de 130 sustratos son oxigenados por las oxigenasas del tolueno y un pequeño grupo de enzimas relacionadas. Las oxigenasas son enzimas mecánicamente versátiles. Estas pueden catalizar reacciones de oxigenación, desaturación, dealquilación, sulfoxidación y de halogenación oxidativa (Cafaro *et al.*, 2002; Lange y Wackett, 1997). Donadores de oxígeno en forma de peróxido u oxígeno molecular (O_2) transfieren oxígeno y un segundo sustrato o cofactor es requerido para generar el restante estado de la enzima. Como el sustrato secundario es típicamente consumido en la reacción, este debe ser continuamente reemplazado o generado para nuevos procesos (Cherry, 2000).

Las enzimas oxidativas microbianas son de particular interés debido a su potencial para sustituir métodos químicos, actualmente usados en una gran variedad de aplicaciones como biosensores, remediación ambiental, síntesis de polímeros, degradación de carbón, degradación de cierto tipos de pulpas para fermentación y producción de papel, etc. (Cherry, 2000).

Las dioxigenasas son bien conocidas como importantes enzimas bacterianas que inician el catabolismo aeróbico de los hidrocarburos aromáticos (Eaton y Chapman, 1995). Estas enzimas son una larga clase que trabajan con mecanismos de óxido-reducción introduciendo moléculas de oxígeno o removiendo electrones desde compuestos orgánicos (hidroxilando los grupos metilo del anillo aromático) (Byrne *et al.*, 1996; Cherry, 2000; Lange, y Wackett, 1997).

Los diferentes tipos de oxigenasas varían en estructura, mecanismo, y requerimiento de cofactores. Las oxigenasas que hidroxilan compuestos aromáticos poseen una dioxigenasa terminal y de una reductasa la cual transfiere electrones desde NADPH a la dioxigenasa terminal. La dioxigenasa terminal reducida cataliza la inserción directa de oxígeno molecular al sustrato (Furukawa, 2000).

Una propiedad muy importante de muchas de estas enzimas es la habilidad de oxigenar el anillo heterocíclico del indol, facilitando la formación de índigo (por oxidación). Esta propiedad ha sido muy valiosa en la identificación de oxigenasas y en la clonación de genes que codifican para oxigenasas (Eaton y Chapman, 1995). Jenkins y Dalton midieron la actividad de ciertas oxigenasas del tolueno en extractos celulares midiendo el incremento en la absorbancia de indoxil a 400nm mediante espectrofotometría. Las oxigenasas del tolueno oxidan el indol a índigo vía indoxil como un colorante azul (Woo *et al.*, 2000).

4.4.2 VÍAS METABÓLICAS

Las bacterias llamadas aromáticas son conocidas por metabolizar hidrocarburos aromáticos, como tolueno, como su única fuente de carbono y energía. Los primeros reportes de los mecanismos bioquímicos indican un ataque inicial al anillo aromático en una reacción de epoxidación y una subsecuente hidrólisis epóxida para tener un trans-dihidrodiol. Investigaciones posteriores indicaron que el intermediario es actualmente un cis-dihidrodiol y su formación fue catalizada por una oxigenasa. Después otra vía del metabolismo bacteriano de degradación de hidrocarburos fue demostrada cuando ocurría vía oxidación del grupo metilo formando alcohol benzílico (Newman y Wackett, 1995).

Las bacterias cuentan con amplias capacidades metabólicas, lo que les permite evolucionar rápidamente para derivar en nuevas vías metabólicas gracias a una división celular más rápida en medios competitivos (Wackett *et al.*, 1995). Varias vías metabólicas han sido propuestas para la degradación de tolueno por parte de comunidades microbianas. En todas estas vías actúan oxigenasas. El catecol es uno de los principales productos de la oxidación aeróbica de compuestos aromáticos mediante bacterias. El subsecuente metabolismo hasta llegar al ciclo del ácido tricarboxílico sigue la vía metabólica por medio de la catecol 2,3-dioxigenasa (Caposio *et al.*, 2002; Keener *et al.*, 2001).

La vía metabólica superior de los genes TOL consisten de una tolueno-monooxigenasa que parece actúa como monooxigenasa cuando la posición orto del sustrato es ocupada por una sustitución electronegativa (Haro y V. de

Lorenzo, 2001) y, dos dehidrogenasas que son las responsables para la producción de ácido benzóico desde tolueno y metilbenzoato desde xileno. La vía metabólica inferior consiste de 13 genes que llevan a cabo el metabolismo del benzoato hasta derivar en intermediarios del ciclo de Krebs (Nishio *et al.*, 2001).

El mecanismo de oxidación biológica consiste en la asimilación de materia orgánica presente en zonas contaminadas por parte de microorganismos, en presencia de oxígeno y nutrientes de acuerdo a la siguiente reacción:

Materia orgánica ($C_5H_7O_2N$) + microorganismos + O_2 = $5CO_2$ + $2H_2O$ + NH_3 (Roig *et al.*, 1993).

Las vías metabólicas conocidas pueden ser manipuladas genéticamente para incrementar los niveles de degradación, o complementar nuevas vías metabólicas para ser insertadas en cepas bacterianas para la degradación de otros tipos de sustancias recalcitrantes (Sayler y Ripp, 2000).

Un método para estudiar y analizar las vías metabólicas de los hidrocarburos por parte de comunidades bacterianas es la cromatografía líquida de alta presión, HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) por sus siglas en inglés, ofrece alta selectividad y sensibilidad (picogramos), excelente separación y resolución, así como es una técnica no destructiva para analizar los 15 principales tipos de hidrocarburos (Williansom *et al.*, 2002).

4.4.3 AISLAMIENTO DE CEPAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS

Tierras contaminadas con vertidos de hidrocarburos, en las que se presume la existencia de microorganismos degradadores de Hidrocarburos aromáticos, fueron colocadas en recipientes de vidrio con solución fisiológica estéril. Estos fueron agitados para atrapar en el sobrenadante las bacterias.

Se tomaron cultivos stock de bacterias mantenidos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una ultrarefrigeradora y se los colocó en biorreactores a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ que contenían medio minimal Bacto Minimal Broth Davis ($1\text{g NH}_4\text{NO}_3$ y $0,25\text{g K}_2\text{HPO}_4$) y tolueno como única fuente de carbono. Los biorreactores fueron oxigenados, por 30 días, con la ayuda de microfiltros (Millipore) para evitar contaminación.

Después de los 30 días se determinó que cepas habían degradado en mayor escala el tolueno. Este proceso se realizó 10 veces por cada stock y 10 veces para la cepa que degradó más rápidamente.

4.4.4 ENSAYOS REALIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS

La cepa que degradó completamente el tolueno fue *Enterobacter cloacae*. Identificada con los kits API 20E bioMérieux. La prueba de Indol-Azul permitió identificar las cepas productoras de Oxigenasas.

Cultivos de *Enterobacter cloacae* fueron sembrados en cajas Petri con medio minimal que contenía 1mM de indol y 0,1% de tolueno y acetona. Las cajas Petri fueron incubadas por 4 días a 37 °C.

Los cultivos usados anteriormente fueron sembrados en nuevas cajas Petri con medio minimal conteniendo 1nM de indol y 0,01% de tolueno y acetona. Las cajas Petri fueron incubadas por 6 días a 37 °C.

Se usó el método espectrofotométrico para esto se sembraron células de *Enterobacter cloacae* en medio minimal por una noche a 37 °C. Luego de dos procesos de centrifugación a 14.000 pmm para lavar con buffer PBS el pelet bacteriano finalmente se lo añadió medio minimal y 100 mM de indol. Posteriormente se analizó la muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm para determinar la presencia de índigo.

Para la purificación de enzimas oxigenasas se usó el método descrito por Rosche en 1995. Se incubaron a 37 °C por 24 horas 3 litros de bacterias *Enterobacter cloacae* en medio luria. Las células bacterianas fueron lavadas, centrifugadas, congeladas y finalmente lisadas. Luego, se centrifugó y se diluyó el sobrenadante con 40 ml de búfer estándar y se lo cargó en una columna de cromatografía de intercambio iónico. Después de la cromatografía, las fracciones correspondientes a la oxigenasa fueron separadas y posteriormente fueron analizadas en HPLC de acuerdo a estándares para este tipo de enzimas.

Para la purificación del DNA plasmídico se utilizó un kit de purificación QIAfilter®. Para ello se tomó una colonia simple desde una caja Petri cultivada por 12 horas a 37 °C y se la colocó en 5 ml de medio luria. La muestra fue incubada por 8 horas a 37 °C a 300 rpm. A este cultivo inicial se lo diluyó 1/500. Se lo incubó a 37 °C por 16 horas a 300 rpm. Posteriormente se centrifugó at 6.000 rpm por 15 min a 4°C. Se resuspendió el pelet en 4 ml de búfer P1 (50mM Tris-Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml Rnasa A). Luego, se añadieron 4 ml de búfer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), se lo mezcló invirtiéndolo y se lo incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se añadieron 4 ml de búfer P3 (3.0 M Acetato de potasio, pH 5,5) frío al lisado y se mezcló inmediatamente invirtiendo el tubo seis veces. Luego, se puso el lisado en el cartucho (filtro) y se lo incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Mientras se incubaba el lisado se equilibró una columna QIAGEN 100 aplicando 4 ml de búfer QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% isopropanol; 0.15% Tritón® X-100).

Luego, se puso el lisado del cartucho en la columna previamente equilibrada. Se permitió al lisado pasar por la resina de la columna por gravedad. Posteriormente se lavó la columna dos veces con 10 ml de buffer QC (1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, ph 7,0; 15% isopropanol). Se eluyó el DNA con 5 ml de búfer QF (1,25 M NaCl; 50mM Tris-Cl, pH 8,5; 15% isopropanol). Para precipitar el DNA eluido, se añadieron 3,5 ml de isopropanol. Se mezcló en un agitador orbital por 30 segundos y se lo centrifugó inmediatamente a 11.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Se lavó el pelet de DNA con 2 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 11.000 rpm por 10 minutos. Por último, se secó el pellet a temperatura ambiente por 2 horas y se lo resuspendió en búfer EB (10mM Tris-Cl pH 8.5).

Para la digestión de DNA Plasmidico Mediante Enzimas de Restricción se mezcló en un microtubo 17 μ l del DNA purificado, 2 μ l de búfer de restricción y 1 μ l de la enzima de restricción BAM HI. Se centrifugó por 10 segundos y se incubó a 37 °C por una hora en un termociclador.

4.4.4.1 Análisis de Fragmentos de Restricción en Gel de Agarosa

La muestra digerida con enzimas de digestión fue colocada en una cámara de electroforesis horizontal junto con una solución de azul de bromo fenol y agua destilada en un gel de agarosa al 0,8% con un tampón de corrida Tris, ácido bórico, EDTA por 4 horas (Clavijo, 2001).

Los pesos moleculares de las bandas en el gel de agarosa fueron calculados usando un marcador de peso molecular (SIGMA).

Para realizar la purificación de DNA se cortó el fragmento del gel de agarosa en el sitio en donde se encontraba la banda de DNA. Se colocó el fragmento en un microtubo y se añadieron 600 μ l de búfer QG. Luego, se incubó la muestra a 50 °C por 10 minutos, mezclando cada 3 minutos durante la incubación. Se añadieron 200 μ l de isopropanol y se mezcló la muestra. Posteriormente, se colocó la mezcla en una columna QIAquick y se centrifugó por 1 minuto a 13.000 rpm a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se pusieron 0,5 ml de búfer QG en la columna y se centrifugó por 1 minuto a 13.000 rpm a 4 °C. Para lavar se añadieron 0,75 ml de búfer PE a la columna y se centrifugó por 1 minuto a 13.000 rpm a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se centrifugó por 1 minuto adicional.

Luego, se dejó la muestra por dos horas a temperatura ambiente para permitir la evaporación del etanol del búfer PE. Se volvió a centrifugar la muestra por 1 minuto. Para eluir el DNA desde la membrana de las columnas se añadieron 100 µl de bufer EB en el centro de la membrana de las columnas y se centrifugó por 1 minuto a 14.000 rpm.

Para la purificación de DNA Genómico Bacteriano se tomaron muestras de cultivos stock de *Enterobacter cloacae* y se las colocó en medio luria. Se incubó las muestras a 37 °C durante 12 horas.

Al día siguiente las muestras fueron centrifugadas el sobrenadante fue removido se resuspendió el pellet en 1 ml de búfer B1 (EDTA; Tris-Cl; Tween 20; Tritón X-100). Se añadió lisozima y proteinasa K, y se incubó la muestra para lograr la lisis celular. Se incubó en búfer B2 (GuHCl; Tween 20). Mientras se incubaba el lisado, se equilibraba dos veces una columna QIAGEN® permitiendo que el búfer fluya a través de la columna por gravedad. Luego, se aplicó el lisado en las columnas y se permitió que pase a través de éstas por gravedad. Se lavó las columnas tres veces con 1 ml de búfer QC. Se eluyó el DNA con 1 ml de búfer QF y posteriormente se lo precipitó con 1,4 ml de isopropanol. Se centrifugó y se lavó el precipitado con etanol al 70% y se lo dejó secar por 2 horas a temperatura ambiente. Por último se resuspendió en 100 µl de búfer EB.

Para purificar DNA genómico para realizar Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se siguió el método de QIAquick PCR Purification Kit Protocol de

QIAGEN, mediante el uso de una columna QIAquick con sus respectivos lavados y etapas de centrifugación para finalmente eluir el DNA.

Los primers para este estudio fueron tomados de regiones altamente conservadas en secuencias de DNA de bacterias que producen oxigenasas. La secuencia de primers se la obtuvo luego de comparar varias secuencias aisladas con la secuencia del gen de la enzima 2-3 catecol oxigenasa.

Para realizar PCR de DNA plasmídico se sembraron células de *Enterobacter cloacae* en agar luria y se los incubó a 37 °C por 12 horas. Se colocaron en un microtubo los primers, nucleótidos, una colonia aislada de la caja Petri y la Taq DNA polimerasa y finalmente fueron colocadas en el termociclador para conseguir las copias requeridas de DNA.

4.4.4.2 Determinación de degradación de Tolueno mediante HPLC

La determinación de la degradación de tolueno fue desarrollada en un HPLC. La columna usada para este trabajo fue una C8 de Allsphere con un diámetro de columna de 150 µm, y un tamaño de partícula de 5 µm. El flujo a través de la columna que se usó fue de 1ml/minuto. La fase móvil utilizada fue de acetonitrilo: agua en una relación 60:40. El detector fue programado para leer picos en el rango de los 254 nm. Para limpiar las columnas, antes de cada trabajo se usó el reactivo de Ling's que consiste de metanol, agua y ácido acético en una relación 30:68:2.

Células de *Enterobacter cloacae* sembradas en medio minimal y colocadas en microtubos fueron incubadas por una noche a 37 °C. Como única fuente de carbono se colocó 100 µl de tolueno antes mezclado con 5 ml de n-hexadecano. Después de ser incubadas se las centrifugó a 14.000 rpm por 10 minutos, luego se las pasó en sobrenadante por un microfiltro con un poro de 0,45 µm (Millipore Corp.) y se las colocó en tubos de colección para HPLC. Posteriormente se puso los tubos en el HPLC y se programó el equipo para poder medir la degradación de tolueno. El marcador estándar usado fue tolueno (Sigma) diluido en agua en una relación de 1/10, 1/100 y 1/1000.

Identificación de vías metabólicas de degradación de Tolueno mediante HPLC

Células de *Enterobacter cloacae* sembradas en medio minimal y colocadas en microtubos, fueron incubadas por una noche a 37 °C. Como única fuente de carbono se colocó 100 µl de tolueno, antes mezclado con 5 ml de n-hexadecano. Después de ser incubadas se las centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, luego se pasó el sobrenadante por un microfiltro con un poro de 0.45 µm (Millipore Corp.) y se las colocó en tubos de colección para HPLC. Seguidamente se puso los tubos en el HPLC y se programó el equipo para poder identificar los compuestos intermediarios de las vías metabólicas de degradación del tolueno. Los compuestos usados como estándares para este trabajo fueron: tolueno, alcohol benzílico, benzaldehído y benzoato.

Aislamiento de cepas degradadoras de Hidrocarburos

Se observó la degradación de tolueno en los bioreactores durante 30 días. En este tiempo se determinó visualmente la degradación de tolueno cada tres días. A un mayor grado de degradación se lo denominó con +++, a un grado medio de degradación con ++, y a un grado bajo de degradación con +.

4.4.5 RESULTADOS: IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS

Luego de los respectivos análisis se determinaron la presencia de 9 cepas bacterianas capaces de usar tolueno como su única fuente de carbono.

Identificación de cepas productoras de Oxigenasas mediante la prueba del Indol-Azul. Después de incubar las cajas Petri con las bacterias por 6 días se observó el crecimiento de colonias bacterianas color índigo

Una vez que las muestras fueron analizadas en el espectrofotómetro se pudo observar un pico prominente a 600 nm con una absorbancia de 0,476.

Al DNA plasmídico purificado se lo sometió al análisis en el espectrofotómetro y se obtuvo como resultado un grado de pureza de 2,0 y una concentración de 0,72 µg/µl.

Cuando se cortó el DNA plasmídico con la enzima de restricción Bam HI se obtuvo 5 bandas que van desde 7.247 pb hasta 14.972 pb. La suma de los pesos moleculares de las 5 bandas fue de 53.717 pb., que es el peso molecular total del DNA purificado.

Al DNA genómico purificado se lo sometió al análisis en el espectrofotómetro y se obtuvo como resultado un grado de pureza de 1,93 y una concentración de 1,42 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Durante las pruebas de degradación de tolueno se observó, en primer lugar, un pico correspondiente a los estándares de tolueno con un tiempo de retención de 11,31 y con una concentración de 1,8760 mM. En pruebas posteriores se pudo determinar la degradación del tolueno, al tener un pico inicial de 1,8753 mM y un pico final de 0,1000 mM.

Durante las pruebas de degradación de tolueno, se usó estándares tomados de una de las cinco principales vías metabólicas de degradación de tolueno. Los resultados obtenidos fueron 4 picos prominentes, correspondientes a tolueno con un tiempo de retención de 7,20, alcohol bencílico con un tiempo de retención de 9,55 y benzoato, con un tiempo de retención de 9.58.

4.4.6 APLICACIONES DE HONGOS EN TRATAMIENTOS DE BIORRECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS

La utilización de la capacidad de degradación de los microorganismos es la base fundamental de los tratamientos biológicos de contaminaciones orgánicas. El conocimiento de las características fisiológicas y bioquímicas así como de la ecología y genética de las especies o consorcios microbianos involucrados, es un requisito esencial, para lograr la descontaminación deseada. Los hongos basidiomicetos ligninolíticos producen un conjunto de enzimas extracelulares para metabolizar la lignina que les confieren, asimismo, la capacidad de degradar un amplio abanico de contaminantes (Moreno *et al.*, 2004)

El tratamiento biológico mediante plantas (fitodescontaminación) implica el uso de vegetales superiores para retirar, contener, acumular o degradar los contaminantes ambientales del suelo, aguas subterráneas, aguas superficiales, sedimentos y aire. Esta definición se aplica a todos los procesos biológicos, químicos y físicos sobre los que pueden influir las plantas (incluyendo la rizosfera con hongos) y que ayudan en la limpieza de espacios contaminados. Las plantas pueden ser usadas en la descontaminación aprovechando su capacidad de mineralizar determinados compuestos tóxicos o de acumular y concentrar metales pesados y otros compuestos inorgánicos del suelo (Khan *et al.*, 2000).

Algunos microorganismos pueden metabolizar productos como combustibles o disolventes, que constituyen un riesgo para la salud humana y para los

ecosistemas en los que son vertidos. Una vez que los contaminantes son degradados, la población microbiana decrece, al consumirse lo que constituía su fuente nutritiva (Moreno *et al.*, 2004).

Los microorganismos deben tener un estado vigoroso, para que se produzca su crecimiento sobre los productos contaminantes. El objetivo de las técnicas de recuperación biológica, es la creación de las condiciones ambientales óptimas para que los microorganismos se puedan desarrollar adecuadamente y provocar la máxima destoxificación. Distintos microorganismos degradan diferentes tipos de compuestos y sobreviven en diferentes condiciones. (Moreno *et al.*, 2004).

Los microorganismos denominados endógenos, son aquellos que se encuentran formando parte del ecosistema que se pretende descontaminar. Para estimular el crecimiento de estos microorganismos y forzar la degradación de los contaminantes, puede que sea necesario establecer unas condiciones de temperatura, oxigenación y contenido de nutrientes determinadas (Moreno *et al.*, 2004).

Procesos de atenuación natural

La atenuación natural incluye diversos mecanismos tales como dispersión, dilución adsorción, volatilización, estabilización y transformación o destrucción de contaminantes por vía física, química o biológica que espontáneamente ocurren (U.S. EPA Remedial Technology Fact Sheet, 1999).

Uno de los componentes más importantes de la atenuación natural es la biodegradación. Muchos de las fracciones de los hidrocarburos del petróleo, más significativas desde el punto de vista ambiental, tales como BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos) y algunos PAH (hidrocarburos policíclicos aromáticos) pueden ser degradados en condiciones ambientales adecuadas. Sin embargo, otros PAH, el MTBE (metil, terbutil éter, un aditivo de la gasolina) y diversos componentes de los hidrocarburos del petróleo no son fácilmente biodegradables. En términos generales, los hidrocarburos del petróleo que son más móviles en el ambiente (excepto el MTBE), son también los más fácilmente biodegradados.

Biodisponibilidad de los contaminantes e interacciones con la matriz del suelo

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta, con relación a la capacidad de biodegradar contaminantes orgánicos hidrofóbicos en el suelo, es el de la biodisponibilidad (Northcott *et al.*, 2000).

Cuando se hace referencia a la biodisponibilidad en suelo, hay que tener en cuenta las características físicas, químicas y biológicas de este compartimento. La textura, granulometría y la composición del suelo determinan sus propiedades físicas y químicas como contenido de agua, oxígeno, sales, arcilla, minerales, materia orgánica y pH.

En general, se puede decir que la evolución y comportamiento de los compuestos orgánicos en el suelo, vienen determinados por los siguientes factores: características del suelo, propiedades de los compuestos y factores ambientales como temperatura y precipitación. La combinación de todos ellos puede hacer que el compuesto siga diferentes vías, como lixiviación a la fase acuosa, biodegradación, volatilización al aire, unión a las fases sólidas del suelo y transferencia a organismos.

A continuación, se incluyen las definiciones propuestas por Weller *et al.* (1998), para intentar sistematizar los distintos tipos de interacciones de los compuestos orgánicos en la matriz del suelo:

1. Residuo ligado covalentemente. Es el compuesto original o un metabolito principal unido covalentemente al sustrato.

2. Residuos solubles ligados covalentemente. Son aquellos que se extraen conjuntamente con la matriz por un procedimiento específico que respeta el enlace covalente.

3. Residuos adsorbidos. Son compuestos originales o metabolitos principales que están ligados a la matriz por interacciones no covalentes reversibles.

4. Residuos inmovilizados (atrapados). Son compuestos originales o metabolitos principales que se retienen con la matriz por efectos estéricos y que se

comportan como residuos ligados a no ser que se modifique la estructura de la matriz.

Aspectos biológicos de la valoración de la biodisponibilidad

Para que la biodegradación tenga lugar deben cumplirse dos requisitos, primero el compuesto debe ser accesible al organismo de que se trate y segundo el compuesto como tal debe ser biodegradable.

Obviamente, tanto la biodisponibilidad como la biodegradabilidad pueden ser valoradas por métodos biológicos y existe un buen número de ensayos estándar utilizando microorganismos. Estos métodos incluyen: mineralización de análogos marcados con ^{14}C hasta $^{14}\text{CO}_2$ (biodegradación), determinación del efecto del contaminante sobre la demanda biológica de oxígeno (biodisponibilidad) o sobre las variaciones de la remoción de carbono orgánico disuelto (biodisponibilidad) (Moreno *et al.*, 2004).

Desde el punto de vista microbiológico es conveniente hacer una serie de consideraciones que pueden aplicarse al tratamiento de cualquier compuesto xenobiótico:

1. La degradación de un compuesto xenobiótico concreto depende de la actividad de varios microorganismos aunque las reacciones secuenciales se deban a un solo miembro del consorcio.

2. Es importante examinar como puede verse afectada la regulación de las vías de degradación por la presencia de diferentes tipos y concentraciones de productos que pueden inducir o inhibir, las vías metabólicas necesarias para la degradación.

3. En ausencia de oxígeno molecular pueden intervenir otros aceptores de electrones que incluyen nitrato, sulfato, carbonato, clorato, Fe (III), Cr (VI) y U (VI).

4. Un aspecto importante a tener en cuenta, es el del envejecimiento de la contaminación en el suelo. Es decir que los compuestos orgánicos se van asociando a los componentes de la matriz del suelo, disminuyendo la disponibilidad de dichos compuestos para la acción degradadora de los microorganismos (Moreno *et al.*, 2004).

5. Tanto en los sistemas acuáticos como terrestres, los microorganismos pueden estar formando biopelículas debido a su capacidad para secretar productos poliméricos. Esto puede favorecer su penetración en la matriz del suelo y prevenir su pérdida por arrastre.

6. Además de la degradación biológica de los contaminantes en el suelo, cualquier metabolito puede experimentar transformaciones que pueden tener importantes implicaciones para los microorganismos y para el ecosistema en general. Los compuestos originados en el metabolismo microbiano de un contaminante pueden ser tóxicos para organismos superiores.

7. Muchos sustratos contienen N, P o S y los microorganismos pueden utilizar alguno de esos elementos, dejando la mayor parte del sustrato intacto.

8. No existen organismos o grupos de organismos de aplicación universal a procesos de biodescontaminación.

Se debe considerar que determinados grupos de organismos, presentan una elevada versatilidad metabólica y son capaces de degradar un amplio espectro de sustratos. Entre estos cabe destacar bacterias Gram+ de los géneros *Rhodococcus sp.*, y *Mycobacterium sp.*, que utilizan compuestos de un átomo de carbono como metano y metanol y que pueden por ejemplo aplicarse a la degradación de tricloroetano. Mientras que las bacterias son consideradas los agentes fundamentales de la biodegradación en los sistemas acuáticos, el papel de los hongos en los sistemas terrestres puede ser igual o incluso mayor.

9. En los ecosistemas acuáticos se ha evidenciado la existencia de concentraciones umbral, por debajo de las cuales las tasas de biodegradación de los compuestos xenobióticos es lenta o incluso inapreciable. Las hipótesis para explicar este hecho, se basan fundamentalmente en la existencia de concentraciones mínimas para la inducción y el mantenimiento de las enzimas de degradación implicadas en el metabolismo de los compuestos orgánicos contaminantes (Moreno *et al.*, 2004).

Química de los hidrocarburos del petróleo

Existen tres grupos mayoritarios en los hidrocarburos del petróleo: alcanos (parafinas), alquenos (olefinas) e hidrocarburos aromáticos (Moreno *et al.*, 2004).

Las parafinas son uno de los principales constituyentes del crudo y se encuentran en la gasolina, queroseno, diesel, aceites combustibles etc. Hay tres tipos de parafinas: alcanos lineales, alcanos ramificados y naftenos. En este último caso, los átomos de carbono están dispuestos en uno o más anillos (Moreno *et al.*, 2004).

Las olefinas se forman durante el proceso de refino del crudo. Estas moléculas se caracterizan por tener dobles enlaces en su estructura. Los hidrocarburos aromáticos pueden ser de un solo anillo: benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX) o contener varios anillos aromáticos como en el caso de naftaleno, antraceno, pireno y otros muchos. Por sus propiedades semivolátiles, tienen gran movilidad y presentan una baja solubilidad en agua, siendo la mayor parte de ellos lipofílicos. La figura 14 indica la estructura química de algunos hidrocarburos policíclicos aromáticos.

La capacidad de los hongos para transformar compuestos orgánicos y llevarlos hasta CO₂ y H₂O ofrece un potencial indiscutible para su utilización en el tratamiento de contaminantes. Ese potencial radica en las características de su sistema enzimático y en su vigoroso crecimiento que les permite, a través del desarrollo de su micelio, colonizar diferentes tipos de sustratos y acceder a los

compuestos que constituyen las contaminaciones más frecuentes de los suelos. El elevado valor de la relación superficie/volumen celular de los hongos filamentosos les convierte en eficaces degradadores en determinados nichos como los suelos contaminados. Por otra parte, los hongos tienen una capacidad muy notable para acumular metales pesados como cadmio, cobre, mercurio, plomo y zinc, lo que está demostrado por los aislamientos realizados en minas de cobre, zinc o plomo (Moreno *et al.*, 2004).

Aunque existen algunos ascomicetos degradadores de lignina, un polímero polifenólico heterogéneo, (Eaton, *et al.*, 1993), los hongos lignolíticos más eficaces se encuentran entre los basidiomicetos. Para ello, cuentan con una batería de enzimas extracelulares, oxidasas y peroxidasas, que contribuyen, en determinadas condiciones, a despolimerizar la compleja estructura de la lignina (Cullen, *et al.*, 1997). La oxidación y ruptura de la molécula de lignina tiene como finalidad principal eliminar dicha barrera química y posibilitar el acceso a los polisacáridos de la madera que constituyen una importante fuente de energía (Jeffries *et al.*, 1990).

La estructura del polímero de lignina, hace que estas enzimas se caractericen por unos mecanismos de acción no específicos que oxidan los anillos aromáticos constitutivos de dicho polímero (Hammel *et al.*, 1997). Las enzimas que participan en este proceso son: lignina peroxidasa (LiP), peroxidasa dependiente de Manganese (MnP) y lacasa, una fenoloxidasas que contiene principalmente cobre. El patrón de expresión de esas actividades enzimáticas depende de los diferentes organismos, mientras unos secretan LiP y MnP (no producen lacasas), otros secretan MnP y lacasas (no producen LiP). Existen otras enzimas asociadas

con las anteriores en la degradación de lignina de una manera indirecta: glioxal oxidasa y superóxido dismutasa que producen H_2O_2 , compuesto requerido para la actividad de LiP y MnP (Leonowicz, *et al.*, 1999). Finalmente, otras enzimas actúan como nexos de unión entre las distintas vías de degradación de la lignocelulosa: glucosa oxidasa, aril alcohol oxidasa, celobiosa quinona oxidorreductasa y celobiosa deshidrogenasa. Leonowicz *et al.* (1999) han propuesto un modelo de interacción de estas enzimas en el proceso de degradación de lignina por hongos ligninolíticos (Leonowicz *et al.*, 1999).

Entre los diferentes xenobióticos que pueden ser transformados por hongos basidiomicetos, se encuentran fundamentalmente: pesticidas, hidrocarburos aromáticos (benzo-pireno, fenantreno, pireno, etc.) compuestos orgánicos clorados (pentaclorofenoles, cloroanilinas, bifenilos policlorados...) azocolorantes, etc. (Barr *et al.*, 1994). Los hongos basidiomicetos de podredumbre blanca han sido utilizados para descontaminar suelos o aguas por su especial capacidad para degradar compuestos xenobióticos del tipo de hidrocarburos aromáticos policíclicos, Asimismo, se ha mostrado la capacidad de estos organismos para decolorar efluentes de industrias aceiteras, textiles o papeleras (Ashoka *et al.*, 2002).

Como se puede constatar en la bibliografía, durante los últimos años se ha producido un importante avance en el conocimiento de la fisiología de los hongos basidiomicetos y su aplicación en procesos relacionados con la degradación de lignina y el tratamiento de contaminantes. Se ha estudiado la capacidad de estos hongos para degradar modificar diferentes sustratos tales como, pulpas papeleras, clorofenoles, hidrocarburos policíclicos aromáticos, lignina kraft, sustratos

lignocelulósicos, etc. con lacasas y MnP de *Trametes versicolor* (De Carvalho *et al.*, 1999).

Se han publicado diversos trabajos de los que se concluye la gran diversidad de basidiomicetos con capacidad de degradar cuatro hidrocarburos aromáticos policíclicos: naftaleno, fluoranteno, criseno y benzo a-pireno. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que la participación de las LiPs, MnPs y lacasas difiere en función de las especies estudiadas y de las condiciones de cultivo (Baker *et al.*, 1995).

El tratamiento del antraceno ha permitido determinar cómo se produce la apertura del anillo aromático por hongos (Hammel *et al.*, 1992). Se ha estudiado, asimismo, la expresión de los genes lip, durante el crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium* y la oxidación de antraceno en suelos contaminados por dicho hidrocarburo. Experimentos en medio sólidos han demostrado la habilidad de diversas especies y/o sus enzimas extracelulares para degradar numerosos hidrocarburos aromáticos (Morgan *et al.*, 1991). También se ha observado esa capacidad en tratamientos *in situ* de suelos contaminados con compuestos xenobióticos, como en el caso de *Phanerochaete sordida* (Lamar *et al.*, 1994). Otros grupos han demostrado la viabilidad de estos tratamientos, en condiciones naturales, depositando inóculos de estirpes miceliales en el suelo y constatando la efectividad de los mismos al obtener reducciones de hasta el 40% para diferentes moléculas de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Chapelle *et al.*, 1996).

En este sentido, experimentos específicos con técnicas de inmunocitoquímica han permitido localizar LiP, MnP y xilanasas sobre maderas atacadas por basidiomicetos (Blanchette *et al.*, 1989). Asimismo, los experimentos llevados a cabo por Lamar et al. (Lamar *et al.*, 1995) utilizando RT-PCR cuantitativa en suelo contaminado por hidrocarburos, permitieron detectar la expresión de genes lip.

El hecho que *P. chrysosporium* haya demostrado su capacidad para degradar fenantreno y que otros hongos oxiden antraceno por algún sistema independiente de lignina peroxidasa (Bogan *et al.*, 1996), sugiere que este grupo de hongos posee mecanismos para degradar polímeros aromáticos, alternativos a los conocidos.

Los hongos degradadores de lignina reúnen características ecológicas y metabólicas muy valiosas ya que son degradadores naturales de compuestos xenobióticos y se encuentran frecuentemente asociados a los espacios contaminados por dichos compuestos. Por otro lado, su capacidad de desarrollarse sobre residuos agrícolas y forestales de bajo coste (Boyle *et al.*, 1995) y el hecho de que sus inóculos puedan ser producidos masivamente mediante técnicas convencionales de uso industrial habitual, les hace candidatos singulares para su utilización en procesos de biorremediación.

4.5 SURFACTANTES EN LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

El proceso de biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos, llevado a cabo con surfactantes, está condicionado por las capacidades fisiológicas de los microorganismos, la estructura química del hidrocarburo, el tipo de surfactante y los factores ambientales del suelo.

Aplicar surfactantes en una biorremediación puede actuar incrementando la biodisponibilidad del hidrocarburo mediante la acción paralela de la desorción y solubilización del contaminante, permitiendo la transferencia de masa y biodegradación. Pero también puede actuar en una inhibición y/o toxicidad de la población microbiana. La revisión de este capítulo tiene por objeto describir los efectos de los surfactantes en el proceso de biorremediación dándole un énfasis a los efectos que influyen en la biodisponibilidad y finalmente discutir sobre los factores que ocasionan la inhibición y toxicidad.

. La respuesta de los microorganismos degradadores de hidrocarburos a un agente surfactante dependerá de una serie de factores tales como la ultraestructura celular, la capacidad de biodegradación o flujo de salida, concentración del surfactante y la biodisponibilidad. Se estima que se necesitan de 10^3 a 10^4 UFC/g suelo de microorganismos para una biodegradación y 10^5 a 10^6 UFC/g de heterótrofos totales en el suelo capaces de metabolizar y mineralizar el contaminante hasta CO_2 y H_2O . Los factores ambientales que influyen en la biodegradación del hidrocarburo son: la presencia de nutrientes, oxígeno, humedad

y una adecuada temperatura. Si se aplican surfactantes junto a estos factores ambientales se puede incrementar considerablemente el proceso de biorremediación (González *et al.*, 2010).

4.5.1 APLICACIÓN DE SURFACTANTES EN LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

La biorremediación se ha visto favorecida con la presencia de surfactantes y/o biosurfactantes, en donde la biodisponibilidad se ha considerado como uno de los factores más benéficos para la biodegradación y la posible inhibición y/o toxicidad como los factores adversos a considerar (González *et al.*, 2010).

Los surfactantes

Los surfactantes son moléculas anfipáticas es decir que tienen una fracción de cabeza polar hidrofílica y una cola hidrofóbica de fracción no polar (Figura 15), manteniéndose principalmente en la interfase aceite/agua o aire/agua (Celik *et al.*, 2008) (Figura 16).

El uso potencial de los surfactantes para remediar suelos contaminados con hidrocarburos depende principalmente de las capacidades fisiológicas de los microorganismos, la estructura química del hidrocarburo y los factores ambientales del suelo (Jayashree *et al.*, 2006).

En un sistema la adición de surfactantes puede tener dos consecuencias: en primer lugar puede mejorar la dispersión y la pseudosolubilización como fue demostrado por Breuil y Kushner quienes señalan que los ácidos grasos C16 y C18 y los surfactantes Triton X-100, FI-70, 75 y Brij, estimulan el crecimiento de *Pseudomonas eruginosa* en hexadecano. En segundo lugar, la presencia de surfactante líquido-líquido puede inhibir la adhesión bacteriana a esa interfaz, reduciendo la tasa de degradación, esto se demostró por primera vez por Aiba *et al* para la degradación de n-dodecano y tetradecano en presencia de Tween 20 y para el n-hexadecano por Mimura *et al.* (1971). La Tabla 8 presenta las ventajas y desventajas de los surfactantes.

Los Biosurfactantes

Algunos microorganismos pueden sintetizar sus propios surfactantes a los cuales se les conoce como biosurfactantes, incluso pueden sintetizar en condiciones extremas, la mayoría son neutros o de carga negativa, se clasifican por su composición química en: glicolípidos, lipopeptidos y lipoproteínas, fosfolípidos, ácidos grasos y poliméricos (Sulbarán *et al.*, 2005). La tabla 9 presenta las ventajas y desventajas de los biosurfactantes (Figura 18).

Van Hamme *et al.* (2006), señalan que el biosurfactante puede tener una actividad antimicrobiana y es probable que los microorganismos produzcan moléculas tales como agentes antagonistas para ganar ventaja competitiva por el sustrato en las comunidades microbianas (es decir, amensalismo). A pesar de que el interés en biosurfactantes va en aumento, estos compuestos no compiten

económicamente con los surfactantes sintéticos. Para ser efectivo, el uso de surfactantes sintéticos en la biorremediación deben ser no tóxicos que imiten la estructura de los surfactantes naturales (Li *et al.*, 2009).

Factores benéficos de los surfactantes en el incremento de la biodisponibilidad

Uno de los parámetros principales que influyen en el alcance de la biodegradación es su biodisponibilidad. Los contaminantes hidrófobos no son fácilmente biodisponibles debido a su baja solubilidad acuosa o su tendencia en adsorberse fuertemente al suelo (Thibault *et al.*, 1996). La biodisponibilidad es el factor más importante para que la degradación biológica termine siendo lenta. La biodisponibilidad limitada de un contaminante se presenta cuando su tasa de degradación por microorganismos está afectada por una barrera físico-química entre el contaminante y los microorganismos. Para comprender mejor el proceso de biodisponibilidad es necesario comprender las interacciones entre el suelo, los contaminantes y los microorganismos (Mihelcic *et al.*, 1993). La Figura 17 muestra el esquema de las interacciones entre microorganismo, el suelo, contaminante y surfactante, en donde se describen las interacciones para la biodisponibilidad.

El efecto más importante del surfactante entre el suelo y el contaminante es la estimulación del transporte de masa del contaminante desde el suelo hasta la fase acuosa, donde se puede dar la biodisponibilidad, la cual está influenciada por; las interacciones de surfactante-células, interacciones célula-contaminante e interacciones de superficie de contaminantes, esto va relacionado con tres

mecanismos; la emulsión de contaminantes líquidos, solubilización micelar y la facilidad de transporte. Un contaminante adsorbido puede facilitar el transporte en el suelo, siendo este el efecto más importante de los surfactantes en biorremediación, por lo tanto, la reducción de la tensión interfacial y de superficie son probablemente los mejores parámetros para la selección del surfactante en la remediación biológica del suelo (Yu *et al.*, 2007). Los factores que influyen en la biodisponibilidad son los siguientes:

La emulsión de contaminantes

Muchos de los contaminantes persistentes tiene baja solubilidad en agua y por tanto la biodisponibilidad es mejorada con la adición de surfactantes, al reducir la tensión superficial e interfacial entre líquidos, sólidos y gases, les permite dispersarse fácilmente en emulsiones (Banat *et al.*, 2000), lo cual se traduce en un aumento de superficie de contacto que permite la mejora de transporte de masa del contaminante a la fase acuosa y la movilidad adsorbida de la fase líquida del contaminante, por lo tanto la movilidad del contaminante a la fase de agua es removido con una emulsión. La emulsificación del surfactante puede aumentar el metabolismo microbiano con el hidrocarburo y puede incrementar la actividad enzimática microbiana o bien facilitar el transporte del sustrato orgánico de las células microbianas (Torres *et al.*, 2005).

Concentración Micelar Crítica

La Concentración Micelar Crítica (CMC) es la concentración mínima para que el surfactante forme agregados llamados "micelas", los cuales son responsables de las propiedades de solubilización y de detergencia. La biodisponibilidad se puede aumentar mediante la adición de los surfactantes en niveles inferiores de la CMC. Un surfactante con un valor menor de CMC puede llegar a solubilizar contaminantes en concentraciones bajas, con un mínimo de exposición de sustancias tóxicas para los microorganismos del suelo (Aronstein *et al.*, 1991). Los surfactantes en determinadas concentraciones por debajo de su CMC mejoran la degradación de los compuestos hidrófobos, porque las altas concentraciones además de ser costosas también pueden ser tóxicas para los microorganismos (West *et al.*, 1992). Merrettig-Bruns y Jelen, señalan que los surfactantes para procesos de biorremediación por lo general están entre 10 mg/L es decir, aproximadamente 10-100 veces inferior a su CMC.

Solubilización micelar

La solubilidad es causada por la presencia de micelas, los compuestos orgánicos hidrofóbicos se disuelven principalmente en el núcleo de las micelas, donde tendrán un transporte micelar de los hidrocarburos a la fase acuosa. Los microorganismos pueden acceder a un sustrato a través de contacto directo con cristales sólidos (ejemplo: azufre elemental, fenantreno) gotas de líquido (ejemplo: el petróleo crudo disuelto en el agua) o por contacto con el sustrato pseudosolubilizado en micelas de surfactante, o gotas de emulsión (Guha *et al.*,

1998). Kim *et al.* (2001), demostraron que la solubilidad de los HAP, usando surfactantes no iónicos, es proporcional con las concentraciones de surfactantes, por encima de la CMC mejora, mientras que por debajo o cerca de la CMC no mejora la solubilidad. El surfactante puede mejorar la biodisponibilidad de dos formas: a) la velocidad de dilución se puede aumentar mediante la separación de los hidrocarburos por las micelas y b) el surfactante puede influir en el proceso de dilución mediante la interacción con la superficie del sustrato, esto afectara la máxima velocidad de dilución y puede aumentar el crecimiento microbiano, cuando están solubilizados están disponibles para ser metabolizados por los microorganismos. La captación del sustrato en micelas por la célula bacteriana se explica en la Figura 19.

Mecanismos del transporte de masa del contaminante

La facilidad del transporte de los contaminantes de la fase sólida a la fase acuosa, debe ser causada por varios fenómenos: la interacción de moléculas de contaminante con surfactante, la interacción de surfactantes con las diferentes fases, la movilidad del contaminante sobre la materia orgánica y las partículas del suelo y la reducción de la tensión superficial del agua sobre los poros de las partículas del suelo (Yeom *et al.*, 1996). Cuando la biodegradación está limitada por la biodisponibilidad del sustrato, la concentración de sustrato en el líquido es muy inferior a la concentración de saturación, esto significa que la facilidad de transporte es el mecanismo más importante que rige la tasa de biodegradación (Tsai *et al.*, 2009). La influencia del surfactante en la biodegradación se logra con la mejora en la transferencia de masa y la tasa de transferencia directa de la micela

al microorganismo, tomando en cuenta que los hidrocarburos se pueden mover por medio de la fase acuosa y/o micelar.

El valor del Balance Lipofílico-Hidrofílico es un parámetro empírico que describe la contribución relativa de la fracción hidrofílica con el peso de la molécula de surfactante. El HLB con un valor de 3 a 6 es lipofílico y puede ser utilizado para preparar agua en aceite (w/o) en las emulsiones y los surfactantes con valor de HLB de 10 a 18 son más hidrofílicos. Kang *et al* señalan que los surfactantes con una mayor HLB (Tween 80, Tween 60 y Tween 20) resultaron en una mejor solubilidad. Torres *et al* (80) señalan que el más alto crecimiento microbiano se observa con Tween 80 (valor mayor a 10 de HLB).

El aumento en la temperatura afecta la biodegradación por medio de dos mecanismos, en primer lugar, puede aumentar la constante de velocidad de desorción y la disminución de los coeficientes de distribución (K_d) y aumenta esto a la biodisponibilidad. En segundo lugar puede mejorar el crecimiento microbiano y su actividad, por lo tanto estimula la tasa de biodegradación. Así que a bajas temperaturas la degradación será lenta (Holliger *et al.*, 1996). Torres *et al.* (2004), señalan que los factores que más influyen en la biodegradación, son en primer lugar la temperatura, en segundo lugar el valor de HLB del surfactante y sorprendentemente en tercer lugar la dosis del surfactante.

4.5.2 FACILIDAD DEL SURFACTANTE DE SER BIODegradado POR LOS MICROORGANISMOS

En un análisis de sorción del suelo debe considerar si se dejan grandes cantidades de surfactante altamente biodegradable en el suelo tratado, puede convertirse en competencia como fuente de carbono, lo que influye en la degradación del sustrato primario (Tiehm, *et al.*, 1994). Los surfactantes que sean fácilmente biodegradables perderán su capacidad de solubilización, por lo que se debe encontrar un equilibrio entre la biodegradación y su eficiencia de solubilización (Li *et al.*, 2009).

Torres *et al.* (2005), informan que existen surfactantes altamente biodegradables como Tween 80 y Surfapcol que se biodegrada alrededor del 45% y 96% respectivamente en un periodo de 168 hrs. Wong *et al.* (2004), señalan que *Pseudomonas aeruginosa* cuando se combina con Tween 80 mejora la solubilidad y degradación de fenantreno, y además el Tween 80 es biodegradable (Singer *et al.*, 1984). White *et al.* (1997), han señalado que existen tres rutas para la biodegradación primaria en los compuestos iónicos: a) ataque y la degradación progresiva del grupo hidrofóbico, b) Ataque y degradación progresiva de grupo hidrofílico y c) Separación de hidrofílico a los grupos hidrófobos.

5. CONCLUSIONES

Hemos analizado que las ventajas del proceso de tratamiento biológico es su diseño simple o escasa infraestructura, alta eficiencia, no utilización ni generación de compuestos tóxicos y posibilidad de tratamiento *in situ* y el control del proceso operativo, los bajos costos y la capacidad para tratar varios tipos de contaminantes y sus subproductos. Las posibles limitaciones de los sistemas de tratamiento biológico son su reducido rendimiento con temperaturas frías y con concentraciones muy altas de las sustancias tóxicas.

El empleo de novedosas tecnologías como la biodegradación o la fitorremediación de cianuro se presentan como una alternativa para el control de la contaminación en las distintas actividades industriales.

Los beneficios del empleo del tratamiento biológico permiten emplear bacterias indígenas con la habilidad de degradar cianuros libres y complejos a niveles de pH que se emplean en las plantas de proceso. Además, del uso de productos agrícolas como fuente de nutrientes para las bacterias responsables.

El trabajo demuestra que los organismos más eficientes en la remoción del cromo en las macrófitas son los hongos específicamente el *Aspergillus* sp., al contrario de las bacterias, estas últimas a pesar que poseen poder de remoción del Cr, no son significativas en esta tarea, de igual forma la combinación entre ellos, hongos y bacterias. Esto posibilita la sorción de cromo III por parte de la macrófita

luego de ser reducido por acción de los hongos, facilitando y optimizando la acción del vegetal.

Se debería realizar investigación a nivel de biología molecular para la identificación del o los genes en *Pseudomonas ambigua* responsables de la producción de la enzima Cr reductasa NADPH-dependiente y reproducirlo de manera segura y técnica de tal forma que la aplicación de la enzima sea más eficaz para la reducción de cromo VI. Esto permitiría usar el producto en ciertos procesos que no sean requeridos los microorganismos y manejar el problema en casos con niveles de concentración alta del contaminante.

Identificar y aislar las cepas de hongos eficientes en la reducción del cromo VI, almacenarlas para posteriormente realizar cultivos masivos, y por biomagnificación, aplicarlos en fuentes emisoras con alto contenido de cromo, antes de ser descargadas al ambiente sean pasadas por cultivos de macrófitas controlados logrando su tratamiento adecuado.

La cepa fúngica de *Paecilomyces* sp, eliminó completamente 50 mg/L de Cr (VI) en el medio de cultivo a los 7 días de incubación en condiciones establecidas. Estos resultados sugieren la potencial aplicación de éste hongo para la biorremediación de sitios contaminados con Cr (VI).

Las técnicas de biorremediación normalmente producen efluentes de bajo costo debido a que los insumos utilizados son comercialmente comunes que se ajustan a los criterios o normativas de descarga establecidos.

Una vez degradados los contaminantes, la población de microorganismos se reduce porque ha agotado su fuente de alimentos. Las poblaciones pequeñas de microorganismos sin alimentos o los microorganismos muertos no presentan riesgos de contaminación y biológicos.

En conclusión, la reducción de Cr (VI) parece ser un eficiente sistema de resistencia a cromato en bacterias; sin embargo, el uso por las cromato reductasas de sustratos alternativos, además de Cr (VI), sugiere que esta actividad reductora ha sido un mecanismo adaptativo promovido por la reciente exposición a cromato.

El Oxígeno es el aceptor de electrones más utilizado por los microorganismos, debido a que proporciona mayor rendimiento en la síntesis de ATP, gracias a la liberación de hidrogeniones generados por la transferencia de electrones que a su vez generan un gradiente electroquímico.

La cinética de biodegradación de fenantreno en la fase micelar con surfactantes no iónicos, la biodisponibilidad de fenantreno fue presentada por una concentración efectiva de fenantreno en la solución micelar disponible para la biodegradación.

La solubilidad junto con el metabolismo microbiano de contaminantes orgánicos es técnicamente factible y tiene potencial como técnica de remediación. El efecto de un sustrato sobre la biodegradación es consecuencia de una

combinación del poder solubilizante del surfactante y la biodisponibilidad del sustrato en las micelas del surfactante.

Cualquier nueva tecnología, como lo es la biorremediación con la aplicación de surfactantes, pueden implicar ciertos riesgos. Sin embargo, reconocer los factores de riesgo es un primer paso para reducirlos o evitarlos.

Los estudios analizados en relación a la aplicación de surfactantes en procesos de biodescontaminación confirman que, de forma general, el surfactante no tiene efectos sobre una ruptura de la membrana celular de la bacteria degradadora.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo-Aguilar, F., A., Analytical speciation of chromium in in-vitro cultures of chromate-resistant filamentous fungi, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**: 392, 269-276, 2008.
- Ackerley, D.F., Gonzalez, C.F., Park, C.H., Blake, R., Keyhan, M., & Matin, A. Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol.** 70, 873-82, 2004.
- Anjana, K., Kaushik, A., Kiran, B. & Nisha, R. Biosorption of Cr (VI) by immobilized biomass of two indigenous strains of cyanobacteria isolated from metal contaminated soil. **J. Hazard Mater** 148, 383-386, 2007.
- Ashoka C, Geetha M. S., Sullia, S.B. Biobleaching of composite textile dye effluent using bacterial consortia. **Asian J Microb Biotech Env Sci**, 4: 65-68, 2002.
- Aust S. D. Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbial Ecology**, 20: 197-209, 1990.
- Baldwin, B. R., C. H. Nakatsu, L. Nies. Detection and Enumeration of Aromatic Oxygenases. 2003.
- Bartlett Robert W. “**Solution mining**” Editorial Taylor & Francis. Segunda Edición. New York, 2007.

Baker Lee C. J., Fletcher M.A., Avila O.I., Callanan J, Yunker S, Munnecke DM.

Bioremediation of MGP soils with mixed fungal and bacterial cultures.

En: RE Hinchee, J Fredickson, BC Alleman (Eds.) Bioaugmentation of site remediation. Columbus Ohio, Battelle Press, 195-202,1995.

Barbieri, P., Arengi, F. L. G. Bertoni, G. Bolognese, F. and Galli. E. Evolution of Catabolic Pathways and Metabolic Versatility in *Pseudomonas stutzeri* OX1.

Antonie Van Leeuwenhoek, 79: 135-140, 2001.

Barr D. P., Aust S. D., Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants.

Environ Sci Technol, 28: 78-87, 1994.

Beckman, D. U., Series 60 Spectrophotometer Operating Instructions: QUANT I, Soft Pac™ Module, Beckman Instruments, Inc., Fullerton USA. 1987.

Bermek H, Li K. C, Eriksson K-EL. Laccase-less mutants of the white-rot fungus

Pycnoporus cinnabarinus cannot delignify kraft pulp. **Journal of Biotechnology**, 66: 117-124, 1998.

Bishnoi, N.R., Kumar, R. & Bishnoi, K. Biosorption of Cr (VI) with *Trichoderma viride* immobilized fungal biomass and cell free Ca -alginate beads. **Indian J Exp Biol.** 45, 657-64, 2007.

Blanchette B, Abad A. R, Farrell R. L, Leathers T. D. Detection of lignin peroxidase and xylanase by immunocytochemical labeling in wood decayed by basidiomycetes. **Appl Environ Microbiol**, 55: 1457-1465, 1989.

Bogan B. W., Schoenike B., Lamar R. T., Cullen D. Expression of *lip* genes during growth in soil and oxidation of anthracene by *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl Environ Microbiol**, 62: 3697-3703, 1996.

Bolton J. R. y Cater S. R., **Aquatic and Surface Photochemistry**, 467-490. G.R. Helz, R.G. Zepp y D.G. Crosby Editores. Lewis, Boca Raton, FL, EEUU, 1994.

Bourbonnais R, Paice M. G., Freiermuth B, Bodie E, Borneman S. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. **Appl Environ Microbiol**, 63: 4627-4632, 1997.

Boyle C. D. Development of a practical method for inducing white-rot fungi to grow into and degrade organopollutants in soil. **Can Journal Microbiolgy**, 41: 345-353, 1995.

Broda P, Birch P. R. J., Brooks P. R., Sims P. F. G. PCR-mediated analysis of ligno cellulolytic genes transcription by *Phanerochaete chrysosporium*: substrate dependent differential expression within gene families. **Appl Environ Microbiol**, 61: 2358-2364, 1995.

Byrne, A. M., and Olsen, R. H. Cascade Regulation of the Toluene-3-Monooxygenase Operon (tbuA1UBVA2C) of *Burkholderia pickettii* PKO1: Role of the tbuA1 Promoter (PtbuA1) in the Expression of its Cognate Activator, TbuT. **Journal of Bacteriology**, 178: 6327-6337, 1996.

Cabré, O. **Genética Molecular: Protocolos de Prácticas**. Barcelona, Universidad Autónoma de Barcelona, 2000.

Cafaro, V., R. Scognamiglio, A. Viggiani, V. Izzo, I. Passaro, E. Notomista, F. dal Piaz, A. Amoresano, A. Casbarra, Piero Pucci, and A di Donato. Expression and Purification of the Recombinant Subunits of Toluene/o-Xylene Monooxygenases and Reconstitution of the Active Complex. **European Journal of Biochemistry**, 269: 5689-5699, 2002.

Cañizares, P., García-Gómez J., Lobato, J., y Rodrigo, M.A., El tratamiento electroquímico en la depuración de efluentes industriales líquidos. *Ingeniería Química*, 188-206, 2004.

Cárdenas, J., Martínez, V., Acosta, I., Remoción de Cromo (VI) por una Cepa de *Paecilomyces* sp Resistente a Cromato. **Información Tecnológica**, 22: 43-50, 2010.

Caposio, P., E. Pessione, G. Giuffrida, A. Conti, S. Landolfo, C. Giunta and G. Gribaudo. Cloning and Characterization of Two Cathecol 1,2-dioxygenase

genes from *Acinetobacter radioresistens* S13. **Research in Microbiology**, 183:69-74, 2002.

Cervantes, C., Gutiérrez, J., Interacciones microbianas con el cromo: Mecanismos y potencial biotecnológico. CONCYTEG. 37: 21-36. 2008.

Cervantes, C., Campos, G., Reduction and efflux of chromate by bacteria In: Nies DH, Silver S (eds). *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. 407-420. Springer-Verlag, Berlin. (2007).

Chapelle, J. A, Lamar R. T, Lestan D, Lestan M. Biological potential of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils. **J Ind Microbiol**, 16: 286-294, 1996.

Cherry, J. R. Directed Evolution of Microbial Oxidative Enzymes. **Current Opinion in Biotechnology**, 11: 250-254, 2000.

Eaton, R.W., and P.J. Chapman. Formation of Indigo and Related Compounds from Indolecarboxylic Acids by Aromatic Acid-Degrading Bacteria: Chromogenic Reactions for Cloning Genes Encoding Dioxygenases that Act on Aromatic Acids. **Journal of Bacteriology**, 177: 6983-6988, 1995.

Cullen, D. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. **J Biotech**, 53: 273-289, 1997.

- Dejonghe W, Berteloot E, Goris J, Boon N, Crul K, Maertens S, Höfte M, De Vos P, Verstraete W, and Top EM. Synergistic Degradation of Linuron by a Bacterial Consortium and Isolation of a Single Linuron-Degrading *Variovorax* Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, 69: 1532-1541, 2003.
- Deng, S. & Ting, Y.P. Polyethylenimine-modified fungal biomass as a high -capacity biosorbent for Cr (VI) anions: sorption capacity and uptake mechanisms. **Environ Sci Technol.** 39, 8490-8496, 2005.
- Domènech X, Wilson F, Jardim y Marta I. Litter. **Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes**, 1987.
- Domínguez O, Ramos M, Sánchez A, **Degradación biológica de contaminantes orgánicos persistentes por hongos de la podredumbre blanca**, (2011).
- Duran M and Contreras N. Alternativa de tratamiento para tierras fuller contaminadas con aceite dieléctrico. **Scientia et Technica** Año XII, 32: 419-424, (2006).
- Eaton R.A., Hale M. D. C. Wood, decay, pests and prevention. London, **Chapman and Hall**, 1993.
- Eby, D. M., Beharry, Z. M., Coulter, E. D., Kurtz, D. M. and Neidle E. L.. Characterization and Evolution of Anthranilate 1,2-Dioxygenase from *Acinetobacter* sp. Strain ADP1. **Journal of Bacteriology**, 183: 109-118, 2001.

Eggen T. Application of fungal substrate from commercial mushroom production - *Pleurotus ostreatus* - for bioremediation of creosote contaminated soil. **Int Biodeterior Biodegrad**, 44: 117-126, 1999.

Ehrlich, H.L. Microbios y metals. **Appl Microbiol Biotechnol**. 48: 687-692. 1997.

Eweis J, **Principios de Biorrecuperación** Editorial Mc Graw Hill. Madrid. 2000.

Filazzola M. T., Sannino F, Rao M. A., Gianfreda L. Effect of various pollutants and soil-like constituents on laccase from *Cerrena unicolor*. **J Environ Qual**, 28: 1929-1938, 1999.

Finn, R.D., Mistry, J., Schuster - Bockler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Assmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Durbin, R., Eddy, S.R., Sonnhammer, E.L. & Bateman, A. 2006. Pfam: clans, web tools and services. **Nucleic Acids Res**. 34, D247– D251.

Furukawa, K. Engineering Dioxygenases for Efficient Degradation of Environmental Pollutants. **Current Opinion in Biotechnology**. 11: 244-249, 2000.

Garbisu, C., and I. Alkorta. Utilization of Genetically Engineered Microorganisms (GEMs) for Bioremediation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 74: 599-606, 1999.

- Gaviria, A, y Meza L. Análisis de alternativas para la degradación del cianuro en efluentes líquidos y sólidos del Municipio de Segovia, Antioquia y en la Planta de beneficio de la empresa Mineros Nacionales, Municipio de Marmato, Caldas. 73: 149, 2006.
- Glaze, W. H, Kang J. W., y Chapin, D. H. **Ozone Sci. & Technol.**, 9: 335-352 (1987).
- González H, Bustillos L, Fernández J, **Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.**, 2010.
- Gray MR, Banerjee DK, Fedorak PM, Hashimoto A, Masliyah JH and Pickard MA. Biological remediation of anthracene-contaminated soil in rotating bioreactors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 40: 933-940, 1994.
- Grey R, Hofer C, Schlosser D. Degradation of 2-chlorophenol and formation of 2-chloro-1,4- benzoquinone by mycelia and cell-free crude culture liquids of *Trametes versicolor* in relation to extracellular laccase activity. **J Basic Microbiol**, 38: 371-382, 1998.
- Guengerich, F.P. Cytochrome P450 Enzymes in the Generation of Commercial **Products Nature**, 1: 359-366, 2002.

Guha S, Jaffe PR and Peters CA. Bioavailability of mixtures of PAHs partitioned into the micellar phase of a nonionic surfactant. **Environ. Sci. Technol**, 32: 2317-2324, 1998.

Hammel, K. E., **Oxidation of aromatic pollutants by lignin-degrading fungi and their extracellular peroxidase**. In: H Sigel, A Sigel (Eds.) Metal ions in biological systems. Vol. 28. Degradation of environmental pollutants by microorganisms and their metalloenzymes. New York, Marcel Dekker, 1992. p. 41-60.

Hammel, K. E., Green B, Gai WZ. Ring fission of anthracene by a eukaryote. **Proc Natl Acad Sci**, 88: 10605-10608, 1991.

Haro, M.A., and V. de Lorenzo. Metabolic Engineering of Bacteria for Environmental Applications: Construction of *Pseudomonas* Strains for Biodegradation of 2-Chlorotoluene. **Journal of Biotechnology**, 85: 103-113, 2001.

Hayashi, K. **Manipulation of DNA by PCR. The Polymerase Chain Reaction**, 1: 3-13, 1994.

Hofrichter M, Vares K, Scheibner K, Galkin S, Sipilä J, Hatakka A. Mineralization and solubilization of synthetic lignin by manganese peroxidases from *Nematoloma frowardii* and *Phlebia radiata*. **Journal of Biotechnology**, 67: 217-228, 1999.

- Huertas M., Luque-Almagro V., Martínez-Luque M., García I., Blasco R., Moreno-vivián C., Castillo F., Roldán M., Biodegradación de cianuro por *Pseudomonas psuedoalcaligenes* CECT5344. Análisis proteómico. *Biotecnología*. 2009.
- Huy, N. Q., S. Jin, K. Amada, M. Haruki, N. B. Huu, D. T. Hang, D. T. Cam Ha, T. Imanaka, M. Morikawa, and S. Kanaya. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 88: 100-102, 1999.
- Keener, W. K., M. E. Watwood, K. D. Schaller, M. R. Walton, J. K. Partin, W. A. Smith, and S. R. Clingenpeel. Use of Selective and Chromogenic Substrates to Differentiate Bacteria Based on Toluene Oxygenase Activity. **Journal of Microbiological Methods**, 46: 171-185, 2001.
- Khan A, Kuek C, Chaudhry M, Khoo C. S, W. J. Hayes W. J. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. **Chemosphere**, 21: 197-207, 2000.
- Kim IS, Park J. S. and Kim K. W. Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic surfactants in soil slurry. **Applied Geochemistry**, 16: 1419–1428, (2001).
- Krishna, K.R. y Philip, L. Bioremediation of Cr (VI) in contaminated soils. **Journal of Hazardous Materials**: 121(1-3) 109-117 (2005).

Lameiras, S., Quintelas, C. & Tavares, T. Biosorption of Cr (VI) using a bacterial biofilm supported on granular activated carbon and on zeolite. **Bioresour Technol.** 99, 801-806, 2008.

Lange, C. C., and L. P. Wackett. Oxidation of Aliphatic Olefins by Toluene Dioxygenase: Enzyme Rates and Product Identification. **Journal of Bacteriology**, 179: 3858-3865, 1997.

Leahy, J.G., and R.R. Colwell. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. **Microbiological Reviews**, 54: 305-315, 1990.

Legrini, O. E. Oliveros y A. M. Braun, **Chem. Rev.**, 93: 671-698 (1993).

Li J. L., Chen B. H. Surfactant-mediated Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **ISSN 1996-1944. Materials**, 2: 76-94, 2009.

Lottermoser Bernd G., **Mine Wastes**, Editorial Springer. Segunda Edición. Berlin. 2007.

Luque V. M., Metabolismo del cianuro y del cianato en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Aplicaciones Biotecnológicas, Analistas Económicos de Andalucía, 2005.

Mac Faddin, J, F., Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Medicina Panamericana. (1980).

Makkar R, Rockne K. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environ Toxicol Chem**, 22: pp. 2280–2292, 2003.

Messarch M and Nies L. Modification of heterothropic plate counts for assessing the bioremediation potential of petroleum contaminated soils. **Environ. Technol**, 18: 639-646, 1997.

Milcic-Terzic J., Y. López-Vidal. M. M. Vrvic, and S. Saval. Detection of Catabolic Genes in Indigenous Microbial Consortia Isolated from a Diesel-Contaminated Soil. **Bioresource Technology**, 78: 47-54, 2001.

Mimura A, Watanabe S and Takeda I. Biochemical engineering analysis of hydrocarbon fermentation III. Analysis of emulsification phenomena. **J. Ferm. Technol**, 49: 255–262, (1971).

Moreno, M. D., **Toxicología Ambiental**, Editorial Mc Graw Hill. Madrid. 2003.

Newman, L.M., and L.P. Wackett. Purification and Characterization of Toluene 2-Monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4. **Biochemistry**, 34: 14066-14076, 1995.

Nishio, T., Patel, A., Wang. Y., Biotransformations Catalyzed by Cloned p-Cymene Monooxygenase from *Pseudomonas putida* F1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 55: 321-325, 2001.

Opperman, D.J., Piater, L.A., & van Heerden, E. 2008. A novel chromate reductase from *Thermus scotoductus* SA- 01 related to old yellow enzyme. *J Bacteriol.* 190, 3076-3082.

Park, K. S., R. C. Sims, and R. R. Dupont. Transformation of PAHs in Soil Systems. **Journal of Environmental Engineering**, 116: 632-640, 1990.

QIAGEN Inc. **QIAprep® Miniprep Handbook for purification of Plasmid DNA.** First Edition. California, USA., 1999.

QIAGEN Inc. **The QIAexpressionist™: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins.** Third Edition. California, USA. 1999.

QIAGEN Inc. **QIAquick® spin Handbook for QIAquick Gel Extraction Kit.** First Edition. California, USA. 2000.

Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-P-erez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J. & Cervantes, C. Mecanismos de resistencia bacteriana al cromo. **Biomaterials**. 21:321-332. (2008).

Ramírez-Ramírez, R., Calvo-Méndez, C., Ávila-Rodríguez, M., Lappe, P., Ulloa, M., Vázquez-Juárez, R. & Gutiérrez-Corona, F. Cr (VI) reduction in a cromate - resistant strain of *Candida maltosa* isolated from the leather industry. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85, 63-68, 2004.

Rauncy, J. L., S. W. Allen. Recent Advances in P450 Research. **The Pharmacogenomics journal**, 1: 178-186, 2001.

Reyes P, Pickard M. A, Vázquez-Duhalt R. Hydroxybenzotriazole increase the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase. **Biotechnol Lett**, 21: 875-880, 1999.

Rodríguez D., Quiros, L. M., Brana, A. F., and Salas, J. A. Purification and Characterization of a Monooxygenase Involved in the Biosynthetic Pathway of the Antitumor Drug Mithramycin. **Journal of Bacteriology**, 185: 3962-3965, 2003.

Roig, M. G., Rodríguez, M. J. M. and Cachaza, J. M. Principles of Biotechnological Treatment of Industrial Wastes. **Critical Reviews in Biotechnology**. 13: 99-116, 1993.

Rosche, B. Tshisuaka, B. Fetzner, S. and Lingens, F. 2-Oxo-1,2-Dihydroquinoline 8-Monooxygenase, a Two-Component Enzyme System from *Pseudomonas putida* 86. **The Journal of Biological Chemistry**. 270: 17836-17842, 1995.

Sambrook, J. Fritsch, E. F. Maniatis, E. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Second Edition. Cold Spring harbor Laboratory Press. New York, USA. 1989.

Sánchez, J. y Rodríguez, J. Biorremediación: Fundamentos y aspectos microbiológicos. *Industria y minería*. 351: 12-16 2003.

Sayler, G. S., and Ripp, S. Field Applications of Genetically Engineered Microorganisms for Bioremediation Processes. **Current Opinion in Biotechnology**, 11: 286-289, 2000.

Schaffner, I. R. Wieck, J. M. Wrigt, C. F. Katz, M. D. and Pickering, E. W. **Microbial Enumeration and Laboratory-Scale Microcosm, Studies in Assessing Enhanced Bioremediation Potential of Petroleum Hydrocarbons**. Special Publication, 1996.

Scott M. J. and Jones M. N. The biodegradation of surfactants in the environment. **Biochemica et Biophysica Acta**, 1508: 235-251, 2000.

Shim, H., and Wood, T. K. Aerobic Degradation of Mixtures of Chlorinated Aliphatics by Cloned Toluene-o-Xylene Monooxygenase and Toluene o-Monooxygenase in Resting Cells. **Biotechnology and Bioengineering**, 70: 693-698, 2000.

Shim H., Ryoo, D. Barbieri, P. and Wood. T. K. Aerobic Degradation of Mixtures of Tetrachloroethylene, Trichloroethylene, Dichloroethylenes, and Vinyl Chloride by Toluene –o-Xylene Monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 56: 265-269, 2001.

Sotsky, J. B., Greer, C. W. and Atlas. R. M. Frequency of Genes in Aromatic and Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation Pathways within Bacterial Populations from Alaskan Sediments. **Canadian Journal of Microbiology**, 40: 981-985, 1994.

- Srivastava, S. y I.S. Thakur, Isolation and process parameter optimization of *Aspergillus* sp. for removal of chromium from tannery effluent, **Bioresource Technology**: 97, 1167-1173, 2006.
- Stuart-Keil, K. G., Hohnstock, A. M. Dress, K. P. Herrick J. B., and Madsen, E. L. Plasmids Responsible for Horizontal Transfer of Naphthalene Catabolism Genes Between Bacteria at a Coal Tar-Contaminated Site are Homologous to pDTG1 from *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4. **Applied and Environmental Microbiology**, 64: 3633-3640, 1998.
- Sugiyama H, Terada H, Shibata H, Morita Y, Kato F. Radiocesium Concentrations in wild mushrooms and characteristics of cesium accumulation by the edible mushrooms (*Pleurotus ostreatus*). **J of Health Sci**, 46 (5): 370-375, 2000.
- Sutherland J. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. **J. Ind Microbiol**, 9:53-62, 1992.
- Timofeevski S. L., Nie G, Reading N. S., Aust S. D., Addition of veratryl alcohol oxidase activity to manganese peroxidase by site-directed mutagenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, 256: 500-504, 1999.
- Torres L. G, Rojas N. and Iturbe R. Use of two-surfactants mixtures to attain specific HLB values for assisted TPH-diesel biodegradation: **Journal of Environmental Sciences (China)**, 16: 950–956, 2004.
- U.S. EPA Remedial Technology Fact Sheet, 1999.

Van Hamme J. D, Singh A. and Ward O. P. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology.

Biotechnology Advances, 24: 604–620, 2006.

Water Treatment Handbook, Degrémont, 6a Edición. Editorial Lavoisier Publishing, Paris, 1991.

Wackett, L. P. Directed Evolution of New Enzymes and Pathways for Environmental Biocatalysis. **Annals New York Academy of Sciences**, p 142-152, 1998.

Williansom, K. S., Petty, J. D., Huckins, J. N., Lebo, J. A., and Kaiser. E. M. HPLC-PFD Determination of Priority Pollutant PAHs in Water, Sediments, and Semipermeable Membrane Devices. **Chemosphere**, 49: 703-715, 2002.

Woo, H. J., Sanseverino, J., Cox, C. D., Robinson K. G. and Sayler, G. S. The Measurement of Toluene Dioxygenase Activity in Biofilm Culture of *Pseudomonas putida* F1. **Journal of Microbiological Methods**. 40: 181-191, 2000.

Yamagata, A., Kato, J., Hirota, R., Kuroda, A., Ikeda, T. Takiguchi, N. and Ohtake. H. Isolation and Characterization of Two Cryptic Plasmids in the Ammonia-Oxidizing Bacterium *Nitrosomonas* sp. Strain ENI-11. **Journal of Bacteriology**, 181: 3375-3381, 1999.

7. FIGURAS

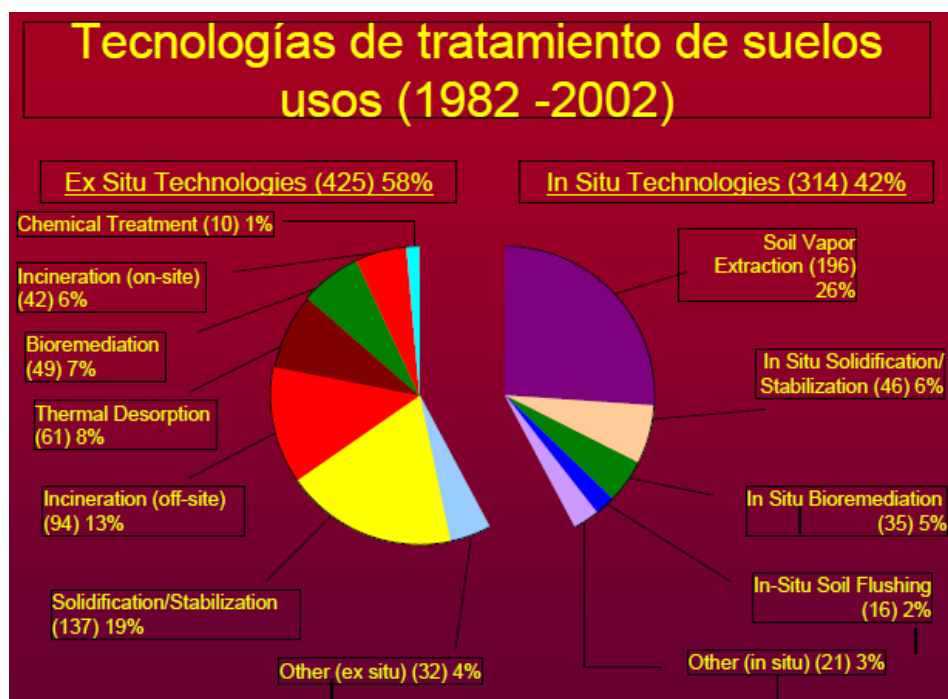


Figura 1. Tecnologías de tratamiento de suelos usos
Medidas biocorrectivas *Ex situ* e *In situ*, porcentaje de uso. Fuente (Reynoso G. 2003).

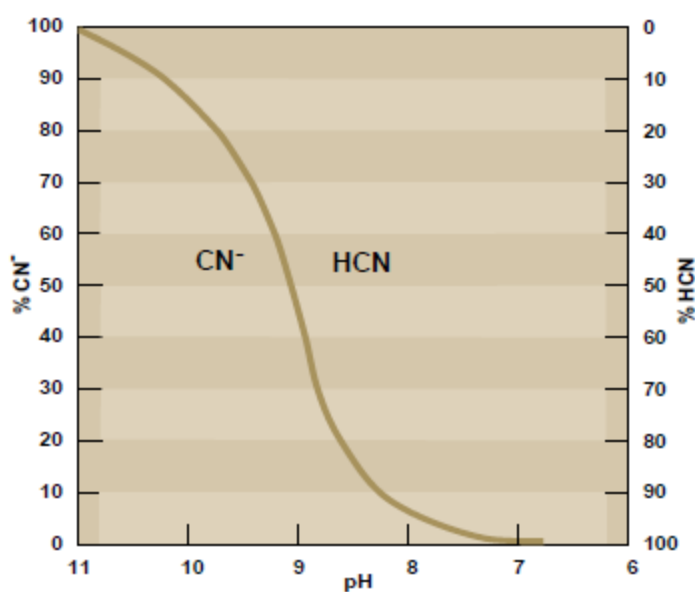


Figura 2. Relación entre Cianuro de hidrógeno HCN y el ion cianuro CN^- con el pH, (Fuente: Scott, J. S., 1981)

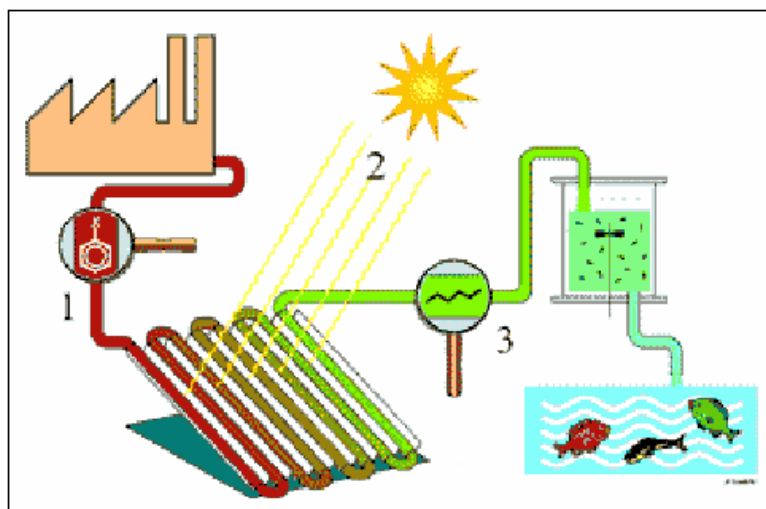


Figura 3. Acoplamiento de procesos de degradación fotocatalítica y biorremediación a nivel industrial

(1) Propiedades fisicoquímicas de los contaminantes y su foto-reactividad. (2) Aplicación de la tecnología de escala de campo solar. (3) Integración de procesos biológicos fotocatalíticos. (Fuente: Parra, 2001)

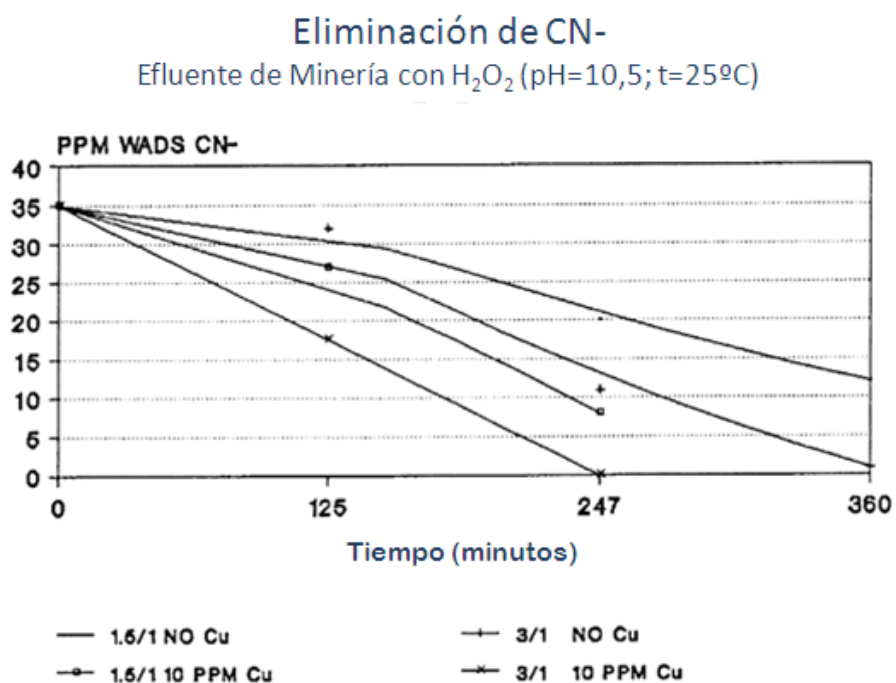


Figura 4. Eliminación de CN⁻ con peróxido de hidrógeno (Fuente: Luque, V., 2005).

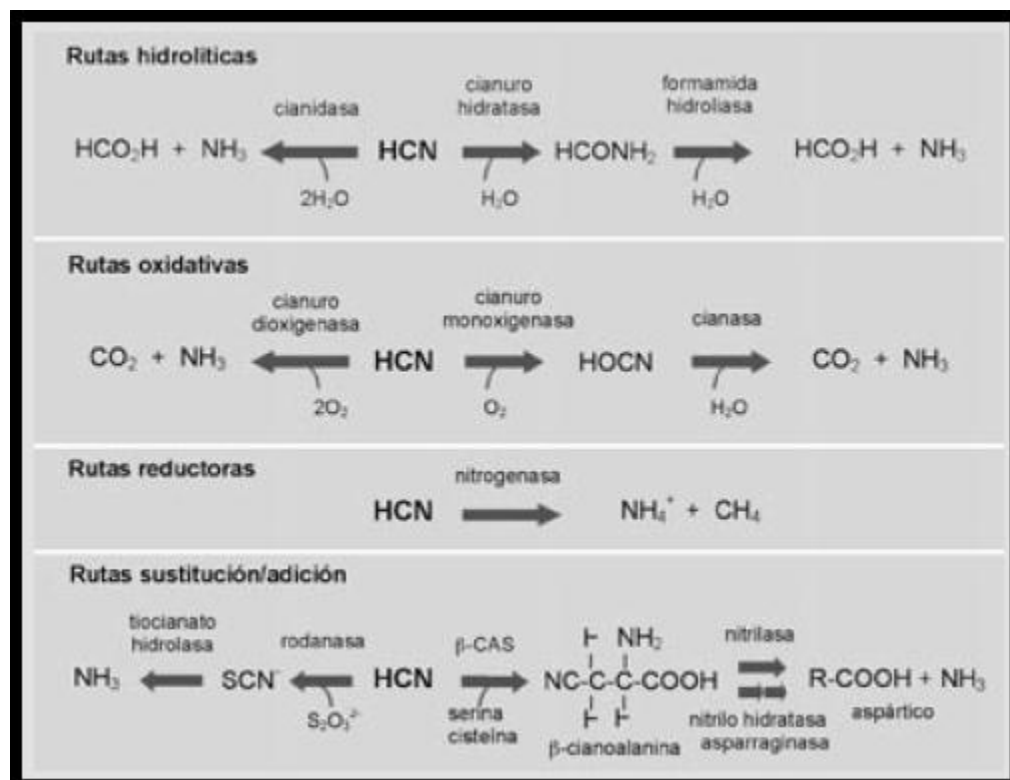


Figura 5. Rutas de degradación de cianuro (Fuente: Luque, V., 2005).

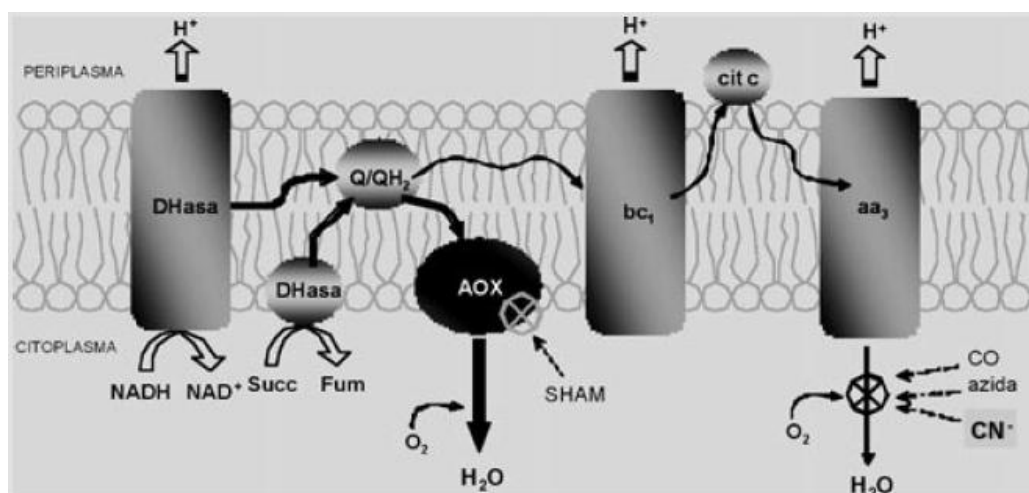


Figura 6. Cadena respiratoria de transporte electrónico

En este esquema se representa el punto de inhibición del cianuro, la posición de la oxidasa alternativa en la cadena respiratoria y el flujo de electrones en presencia (flechas gruesas) o ausencia (flechas delgadas) de cianuro. AOX: oxidasa alternativa. SHAM: salicilhidroxamato. Succ.: succinato. Fum.: fumarato. (Fuente: Luque, V., 2005).

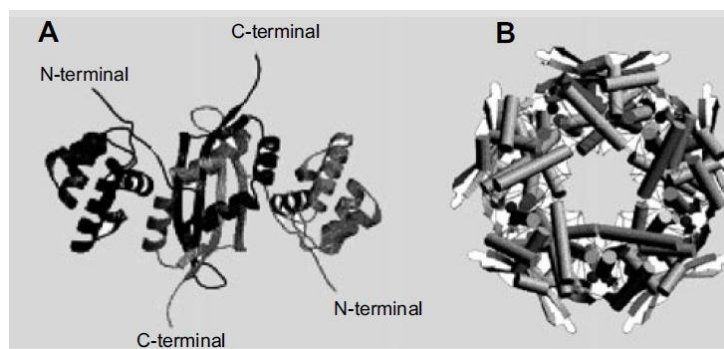


Figura 7. Estructura de la cianasa de *Escherichia coli*. (A) Diagrama de cintas del dímero de la cianasa. Los monómeros se gris oscuro y gris claro. (B) Representación del decámero de la cianasa (vista desde abajo) (Fuente: Luque, V., 2005).

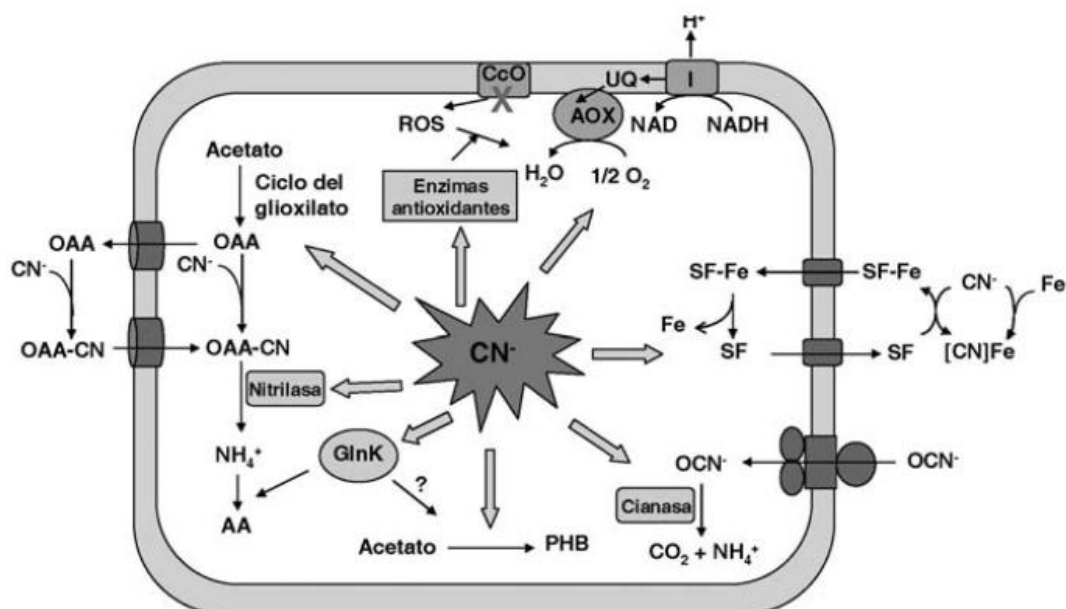


Figura 8. Degradación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 rol de oxalacetato y su cianhidrina. Oxalacetato (OAA), Oxidación avanzada (AOX), Citocromo Oxidasa (CcO) (Fuente: Luque, 2005).

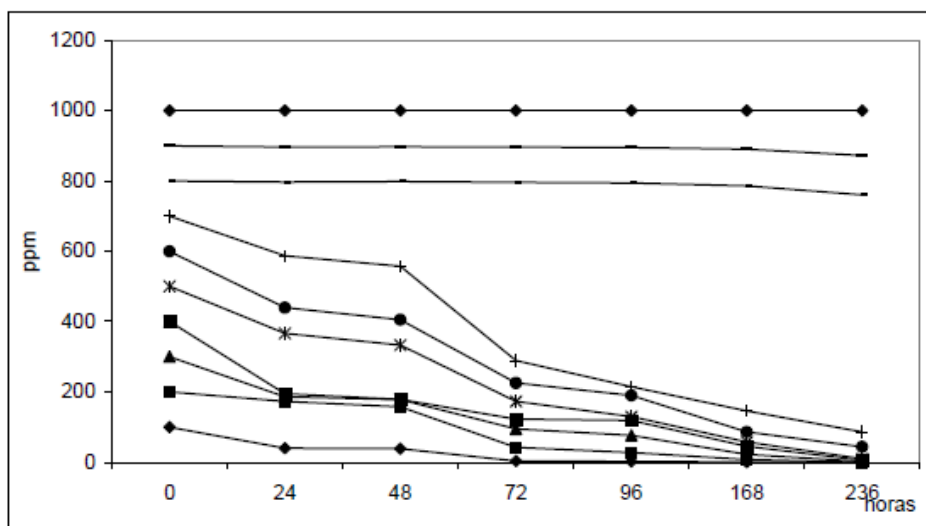


Figura 9. Biodegradación de cianuro con las cepas nativas de *P.fluorecens* a diferentes concentraciones de NaCN (Fuente Restrepo *et al.*, 2006).

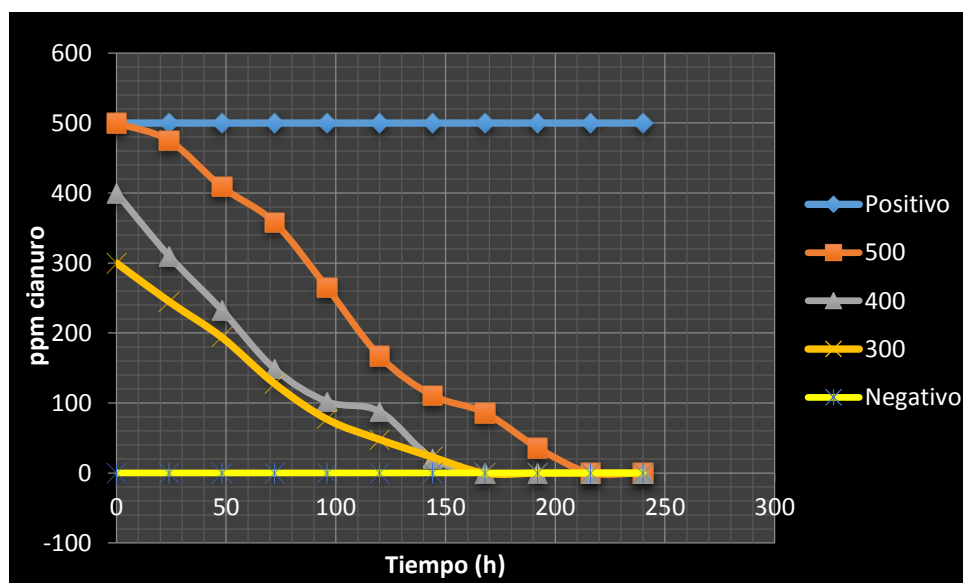


Figura 10. Biodegradación de cianuro con *Pseudomonas fluorescens*, distintas concentraciones de Cianuro de sodio, control positivo y control negativo (Fuente: Restrepo *et al.*, 2006).

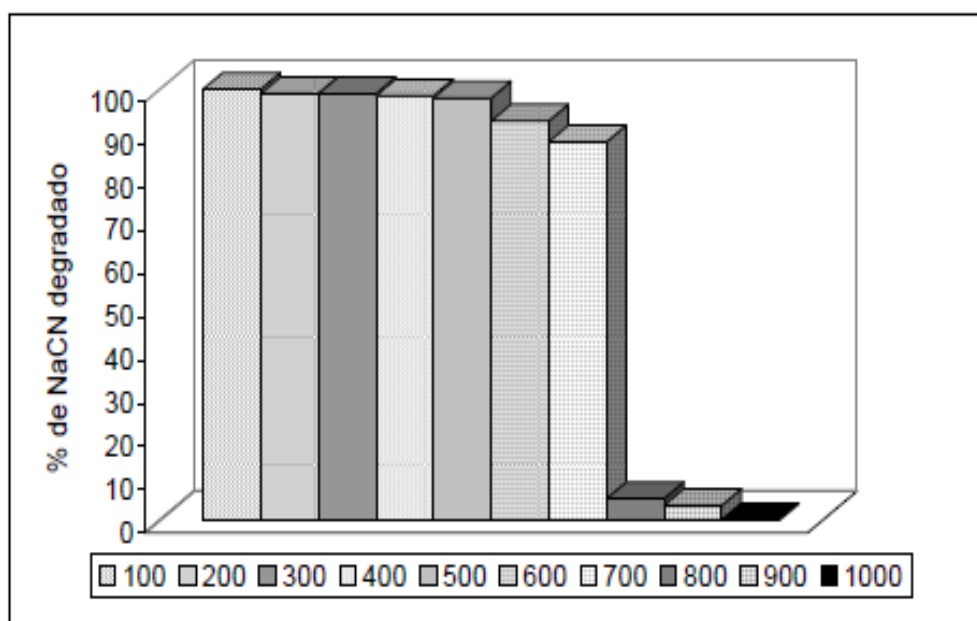


Figura 11. Porcentaje de eficiencia en la biodegradación de cianuro con las cepas nativas de *P.fluorecens* a diferentes concentraciones de NaCN (Fuente: Restrepo *et al.*, 2006).

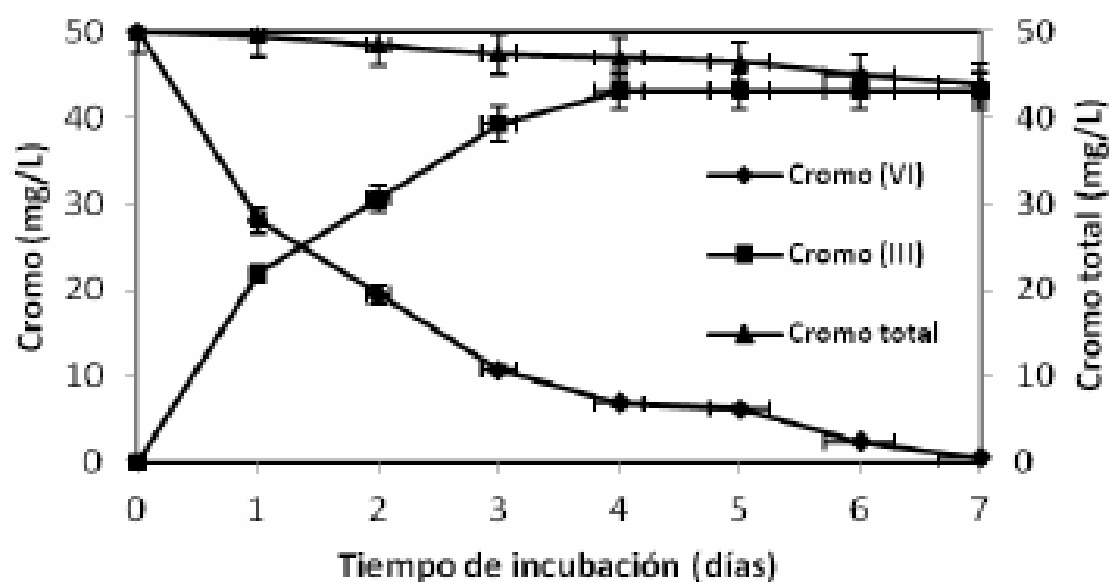


Figura 12. Reducción de Cr (VI) a Cr (III) en Medio Mínimo de Lee conteniendo 50mg/L Cr (VI), pH 4.0, 100rpm, 28 °C, fuente (Fuente: Cárdenas-González y Acosta-Rodríguez, 2011).

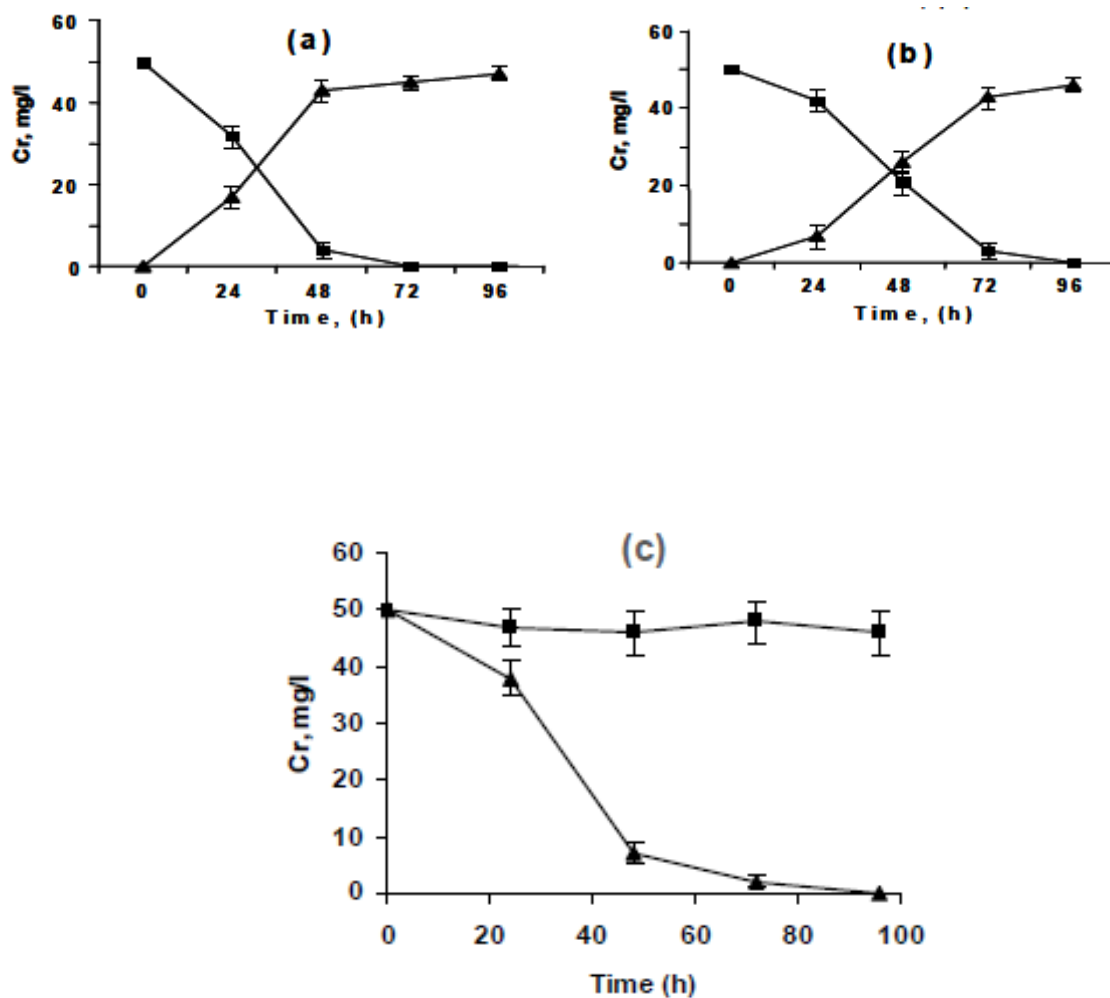


Figura 13. Disminución en los niveles de Cr(VI) (cuadros) y producción de Cr(III) (triángulos) en el medio de cultivo de las cepas H13 de *Penicillium* sp (a) y Ed8 de *Aspergillus niger* (b), (c) Remoción del Cr(VI) presente en el efluente de una cromadora por biomasa de la cepa H13. Cuadros, control no inoculado; triángulos, cultivo con biomasa de la cepa. (Fuente: Acevedo *et al.* 2006).

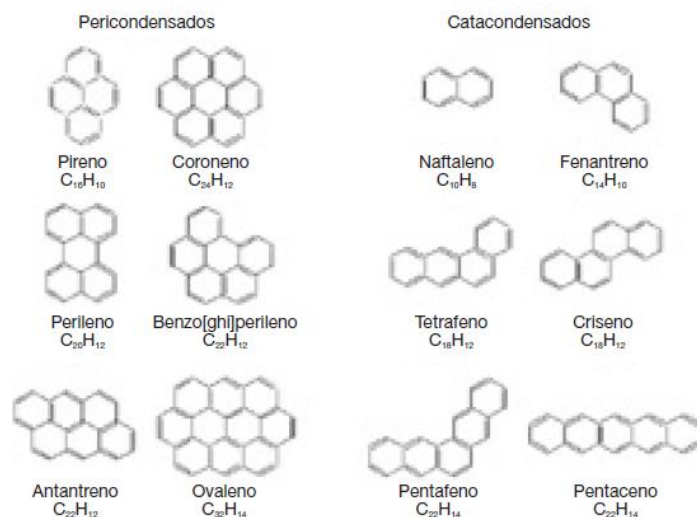


Figura 14. Estructura de algunos hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP's) (Fuente Moreno *et al.*, 2004)

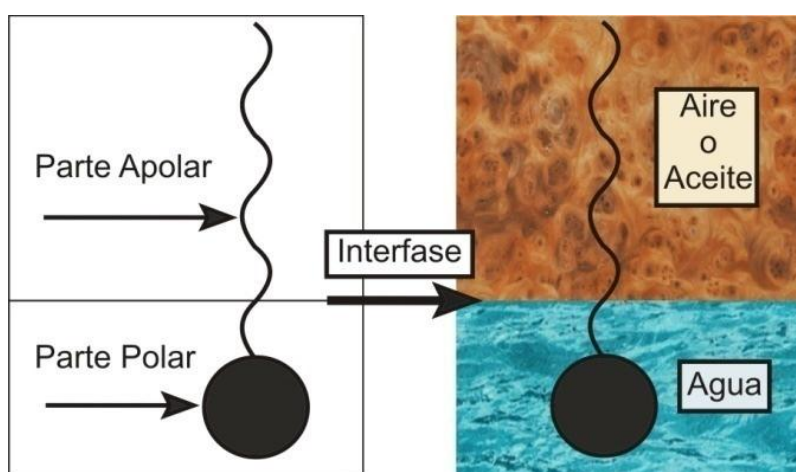


Figura 15. Ubicación de la molécula de surfactante en la interfase. Si el surfactante está dentro de la fase acuosa, su grupo polar puede estar rodeado de moléculas de agua (solvatación). Si el surfactante está disuelto en una fase oleica, su grupo apolar posee interacciones con el solvente. (Fuente: Celik GY, *et al.*, 2008).

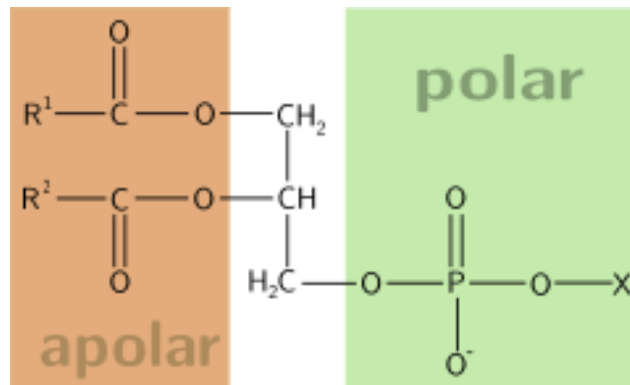


Figura 16. Los fosfolípidos tienen un comportamiento anfipático
(Fuente: Celik *et al.*, 2008).

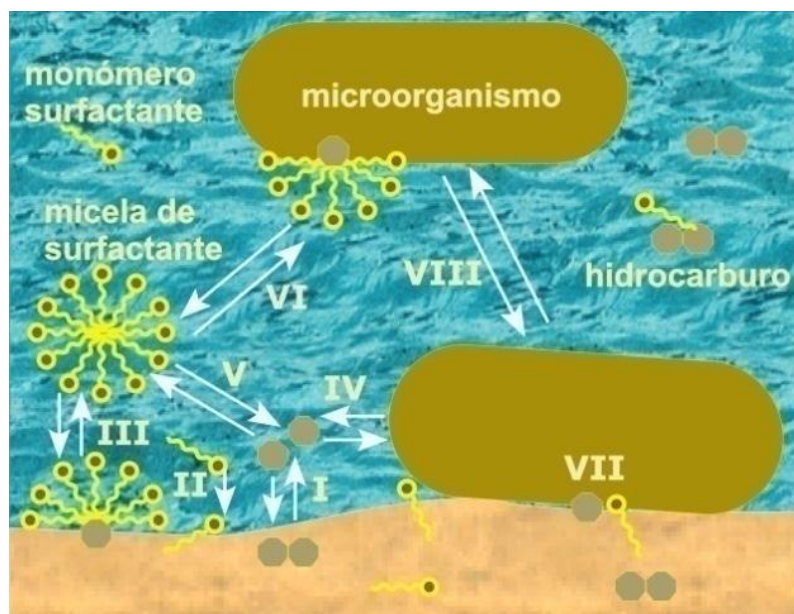


Figura 17. Las fases de interacciones: I.- sorción de contaminantes, II.- sorción de la molécula de surfactante, III.- solubilización del contaminante, IV.- contaminante fase acuosa para los microorganismos, V.- partición de contaminante entre la fase agua y la micela, VI.- sorción de micela al microorganismo, VII.- contaminante fase sólida al microorganismo y VIII.- sorción del microorganismo al suelo (Fuente: Volkering F, *et al.*).

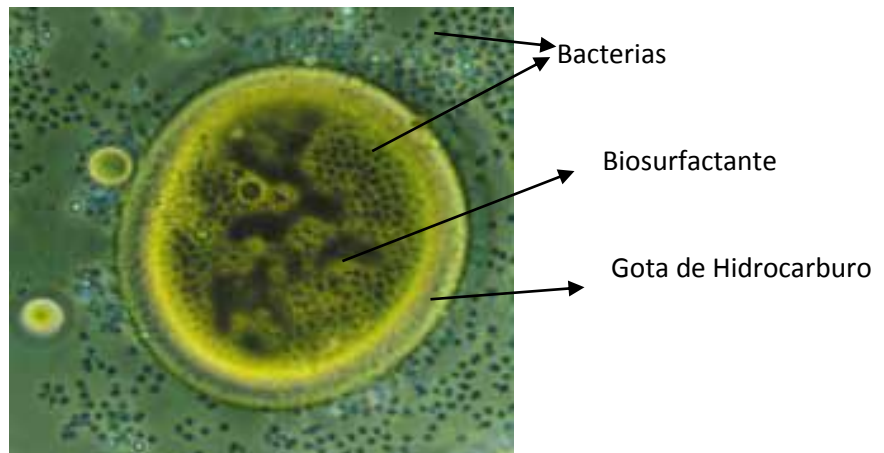


Figura 18. Observación al microscopio de contraste de fases (1000x) de bacterias de la cepa AC rodeando y degradando una gotícula de hidrocarburo. Nótese la importancia de la interfase y el cambio de color que denota la producción de biosurfactante (Fuente: Sánchez y Rodríguez, 2003).

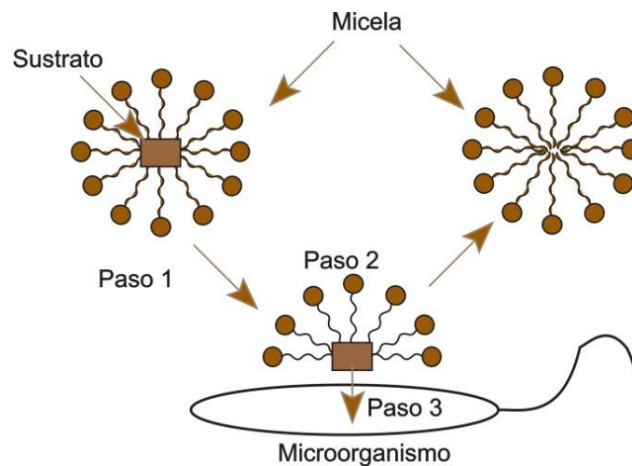


Figura 19. La transferencia de masa de micelas a la célula bacteriana se compone de tres pasos: Primer paso: es el transporte de la micela solubilizada con el sustrato. Segundo paso: es el intercambio de las moléculas del surfactante (micelas) con la célula, esta etapa se puede interpretar cómo el proceso para la degradación, y finalmente el Tercer paso: es la transferencia del sustrato a la célula bacteriana. (Fuente: Imagen modificada de Guha S, *et al.*, 1998).

8. TABLAS

Tabla 1 Tecnologías avanzadas de oxidación (TAOs)

Procesos no fotoquímicos	Procesos fotoquímicos
Ozonización en medio alcalino (O_3/OH)	Oxidación en agua sub/ y supercrítica
Ozonización con peróxido de hidrógeno (O_3/H_2O_2)	Procesos fotoquímicos
Procesos Fenton (Fe^{2+}/H_2O_2) y relacionados	Fotólisis del agua en el ultravioleta de vacío (UVV)
Oxidación electroquímica	UV/peróxido de hidrógeno
Radiólisis γ y tratamiento con haces de electrones	UV/ O_3
Plasma no térmico	Foto-Fenton y relacionadas
Descarga electrohidráulica - Ultrasonido	Fotocatálisis heterogénea

Fuente: Doménech X., 2001

Tabla 2 Potenciales redox de algunos agentes oxidantes.

Especie	E^0 (V, 25° C)
Flúor	3,03
Radical hidroxilo	2,80
Oxígeno atómico	2,42
Ozono	2,07
Peróxido de hidrógeno	1,78
Radical perhidroxilo	1,70
Permanganato	1,68
Dióxido de cloro	1,57
Ácido hipocloroso	1,49
Cloro	1,36
Bromo	1,09
Yodo	0,54

Fuente: Doménech X., 2001

Tabla 3 Concentraciones de cianuro presente en algunas plantas seleccionadas

Especies de plantas	Concentración (mg/kg)
Yuca	
Hojas	377 - 500
Raíces	138
Raíces desecadas	46 - <100
puré	81
Punta de bambú	max 8000
Poroto blanco (judía)	2100
Almendra (amarga)	280 - 2500
Sorgo (planta joven)	max 2500

Fuente: Eisler; 1991

Tabla 4 Tratamientos químicos de eliminación de cianuro

Método	Reacción	Observaciones
Cloración alcalina	$\text{NaCN} + \text{Cl}_2 \rightarrow \text{CNCl} + \text{NaCl}$	Método más antiguo
	$\text{CNCl} + 2\text{NaOH} \rightarrow \text{NaCNO} + \text{H}_2\text{O} + \text{NaCl}$	Requiere pH Básico
Ozonización	$\text{NaCN} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NaCON} + \text{O}_2$	Elevado Coste
Peróxido de Hidrógeno	$\text{NaCN} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{NaCNO} + \text{HO}_2$	Utilización de Cu como catalizador
Dióxido de azufre	$\text{NaCl} + \text{SO}_2 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaCNO} + \text{H}_2\text{SO}_4$	
ácido de caro	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_5 + \text{H}_2\text{O}$	Formación del ácido de caro

Fuente: Luque, V., 2005.

Tabla 5 Vías de biodegradación de cianuro

Compuesto degradado	Microorganismo involucrado	Reacción
HCN vía HNCO	<i>P. fluorescens</i>	$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{HCN} + \text{O}_2 \rightarrow \text{HNCO} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+ + \text{HCNO} + \text{H}_2\text{OCO}_2 + \text{NH}_3$
HCN	<i>Stemphylium loti</i>	$\text{HCN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCONH}_2$
HCN	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	No precisado en la literatura
NaCN	<i>P. putida</i>	No precisado en la literatura
KCN	<i>Pseudomonas stutzeri</i> AK 61	No precisado en la literatura
KCN	<i>Bacillus pumilus</i> C1	No precisado en la literatura
Cianuros orgánicos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No precisado en la literatura
HCN	Cultivos mixtos - no se ha determinado un microorganismo anaerobio específico	$\text{HCN} + 2\text{H}_2\text{OHCOO}^- + \text{NH}_4^+$ En condiciones metanogénicas

Fuente: Guerrero *et al.*, 2002.**Tabla 6 Características generales de *Pseudomonas fluorescens***

Característica	Resultado
Producción de pigmentos piocianínicos	-
Reacción oxidasa	+
Reacción catalasa	+
Fermentación de carbohidratos	-
Producción de pioverdina	+
Prueba Indol	-
Tolerancia a la cetrimida	+
Reducción de nitratos	+
Crecimiento autótrofo con H_2	-
Movilidad	+
Utilización de citrato	+
Crecimiento a 41 °C	-
Prueba ureasa	+
Prueba lipasa	-

+: Resultado positivo

-: Resultado negativo

Fuente: Córdoba, 2000.

Tabla 7 Composición de bacterias en el suelo.

Género	Bacterias en el suelo (%)
<i>Arthrobacter</i>	5-60%
<i>Bacillus</i>	5-67%
<i>Pseudomonas</i>	3-15%
<i>Agrobacterium</i>	1-20%
<i>Alcaligenes</i>	1-20%
<i>Flavobacterium</i>	1-20%
<i>Corynebacterium</i>	2-12%
<i>Micrococcus</i>	2-10%
<i>Taphylococcus</i>	<5
<i>Xanthomonas</i>	<5
<i>Mycobacterium</i>	<5

Fuente: Schaffner *et al.*, 1996

Tabla 8 Ventajas y desventajas de los surfactantes

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se le atribuye el aumento de solubilidad y biodisponibilidad. ▪ De fácil comercialización, distribución y a bajo costo. ▪ Mejora la degradación del hidrocarburo. ▪ Algunos son biodegradables ▪ Se podría utilizar como sustrato primario cuando el contaminante se degrada co-metabólicamente 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Su toxicidad y los efectos de los intermedios (residuos) suelen ser más tóxicos que los compuestos originales ▪ Degradación preferencial del surfactante, puede disminuir la degradación del contaminante, la degradación del surfactante reducirá el efecto de la biodisponibilidad

Fuente: Mimura *et al.*, 1971.

Tabla 9 Ventajas y desventajas de los biosurfactantes

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Son biodegradables ▪ Menos tóxicos que los sintéticos ▪ Las moléculas de superficie se adaptan a los cambios de sustrato de crecimiento ▪ Tienen estructuras definidas ▪ Mejora la degradación del hidrocarburo ▪ Se le atribuye el aumento de solubilidad y biodisponibilidad ▪ Son amigables al medioambiente. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La producción a gran escala de biosurfactantes es compleja y difícil. ▪ Algunos biosurfactantes pueden ser tan tóxicos como los sintéticos. ▪ Pueden competir con el hidrocarburo como sustrato preferencial ▪ La producción de biosurfactantes no es económicamente viable.

Fuente: Sulbarán *et al.*, 2005.